مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

اثر استروژنیک جنستئین بر القای زرده‌سازی در جنس نر مولدین ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

الهام نظافتیان *، وحید زادمجید

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۵/۰۸/۲۱
اصلاح: ۹۶/۰۴/۰۲
پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۶

کلمات کلیدی:
۱۷ بتا- استرادیول
جنستئین
ماهی قرمز
ویتلوژنین

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر اثر استروژنیک جنستئین و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول بر ساخت ویتلوژنین مولدین نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*) مورد مطالعه قرار گرفت. ماهیان مولد نر با ۵ میکروگرم بر گرم (G5) و ۵۰ میکروگرم بر گرم جنستئین (G50)، ۱۰ میکروگرم بر گرم هورمون ۱۷ بتا- استرادیول (E2)، ۱۰ میکروگرم بر گرم روغن ذرت + دی‌متیل سولفوکساید یک روز در میان به مدت ۱۰ روز قبل از اسپرم‌گیری تحت تزریق قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۰ روز از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. تحریک ساخت ویتلوژنین در سرم خون ماهیان تیمار شده به‌صورت غیرمستقیم با اندازه‌گیری ALP، هورمون ۱۷ بتا- استرادیول و شاخص‌های بیوشیمیایی کلسیم، فسفر و تریگلیسرید به‌عنوان نمایندگان ویتلوژنین موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح ALP سرم خون ماهیان تیمار شده با (G50) جنستئین و سطح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول در تیمارهای E2 و G50 افزایش معنی‌داری یافت ($P<0/05$). آزمون تجزیه رگرسیون نشان داد که بین غلظت ALP و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول و فسفر و تریگلیسرید سرم خون رابطه مثبت معناداری وجود دارد ($P<0/05$). بااین‌حال همبستگی بین ALP و غلظت‌های کلسیم معنی‌دار نبود ($P>0/05$). نتایج نشان می‌دهد که دوزهای بالای جنستئین با افزایش سطح ALP سرم خون موجب تحریک سنتز ویتلوژنین می‌شود که این موضوع باوجود یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار بین غلظت ALP و فسفر و کلسترول و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول مورد تأیید قرار می‌گیرد.

مقدمــه

فیتواستروژن‌ها ترکیبات طبیعی مشتق شده گیاهی و هورمون‌های ضعیفی هستند که ساختار استروئیدی داشته و فعالیت زیستی شبه استروژنی به‌ویژه شبیه استرادیول را دارا می‌باشد. فیتواستروژن‌ها به این‌صورت تعریف می‌شوند که ازنظر ساختمان و عمل شبیه ۱۷ بتا-استرادیول (E2) می‌باشند و یا این‌که اثراتی شبیه استروژن را ایجاد می‌نمایند (Knight *et al*., 1995). اصلی‌ترین گروه فیتواستروژن‌ها ایزوفلاون‌ها هستند که تقریباً به‌طور اختصاصی در خانواده نخودیان[1] یافت می‌شوند. گیاه سویا که از خانواده نخود است و یکی از منابع غنی از ایزوفلاون‌ها به شمار می‌رود. جنستئین[2] فراوان‌ترین و بیش‌ترین فعالیت بیولوژیکی را در میان ایزوفلاون‌های سویا دارا می‌باشد (Pollack *et al*., 2003). جنستئین دارای یک ساختمان دی‌فنول است که شباهت نزدیکی با ساختار هورمون ۱۷ بتا-استرادیول دارد (Ng *et al*., 2006)، این ویژگی، جنستئین را قادر می‌سازد تا به

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: e.nezafatian@gmail.com

[1] Leguminosae
[2] Genestein

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

گیرنده‌های استروژنیک[3] (ER) اتصال یابد (Dixon and Ferreira, 2002). جنستئین به دلیل شباهت ساختاری‌اش با ترکیبات استروژنیک توانایی نسبتاً ضعیفی در اتصال به گیرنده‌های استروژنیک دارد و در ماهیان استخوانی به گیرنده‌های استروژنیک کبدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) و تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) اتصال یافته و گزارش شده که قدرت آن ۱۰۰ تا ۲۰۰ برابر کمتر از ۱۷ بتا-استرادیول است (Latonnelle *et al.*, 2000). با توجه به اینکه ویتلوژنین گلیکوپروتئین زرده تخم است و در کبد ماده تولید می‌شود؛ القاء آن در ماهی نر نشان‌دهنده تخریب غدد درون‌ریز است (Green and Kelly, 2009). القای زرده سازی در جنس ماده مهره‌داران ازجمله ماهیان فرآیندی معمول است. با این‌وجود سطوح این گلیکولیپوفسفوپروتئین در پلاسمای جانوران نر و نابالغ پایین بوده و یا غیرقابل سنجش می‌باشد (Wheeler *et al.*, 2005). از طرفی نرها و نابالغ‌ها نیز (مانند ماده‌ها) دارای گیرنده‌های استروژنیک کبدی بوده و قرارگیری در معرض ترکیبات شبه استروژنیک منجر به سنتز این پروتئین در آن‌ها می‌گردد. این موضوع موجب شده که زرده سازی توسط نرها و نابالغین به‌عنوان یک نشانگر زیستی از مواجهه با ترکیبات شبه استروژنیک در نظر گرفته شود (Kime *et al.*, 1999). درواقع یکی از عملکردهای ایزوفلاون جنستئین توانایی تأثیر بر پروتئین‌های گیرنده هورمون‌های جنسی و تأثیر بر روی تنظیم استروئیدوژنز و مقدار هورمون‌های در گردش است (Gatlin *et al.*, 2007) که باعث ایجاد تأثیرات مخرب بر سیستم تولیدمثلی حیوانات (Nagao *et al.*,2001) ازجمله ماهیان می‌شود. به‌عنوان‌مثال افزایش قابل‌توجهی از سطح ویتلوژنین سرم خون در ماهیان باس راه‌راه تحت تماس با غلظت‌های مختلف جنستیئن مشاهده شده است (Pollack *et al.*, 2003). Bennetau-Pelissero و همکاران (2001)، گزارش کردند که تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) از جیره غذایی غنی‌شده با جنستئین موجب القاء ویتلوژنین و کاهش غلظت و تحرک اسپرم در زمان تخم‌ریزی می‌شود. برخی از مطالعات دیگر نیز حاکی از آن است که جنستئین باعث کاهش کیفیت اسپرم در گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و اردک‌ماهی (*Sander vitreus*) (Green and Kelly, 2008) شده است. امروزه سویا در مقایسه با سایر منابع پروتئینی گیاهی به‌عنوان منبع اصلی پروتئینی جایگزین پودر ماهی در غذای ماهی مورد ارزیابی قرارگرفته است و در حال حاضر تا حدی جایگزین پودر ماهی بدون تأثیرات منفی بر عملکرد رشد ماهیان شناخته‌شده است (Noble *et al.*, 1998; Kaushik *et al.*, 1995; Refstie *et al.*, 2010). از طرفی، جنستئین بیشترین فیتواستروژن سویا را تشکیل می‌دهد اما مصرف فیتواستروژن‌ها بستگی به سطح مصرف خوراک و فرمول رژیم غذایی ماهیان دارد (Cleveland and Manor, 2015)؛ بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیرات استروژنیک جنستئین در دو دوز خوراکی (۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن) می‌باشد که به‌طور طبیعی در جیره‌هایی که نیمی از پروتئین آن حاوی پودر سویا یا کنسانتره پروتئین سویا است، یافت می‌شود و ماهیان روزانه در تماس با آن هستند (Cleveland and Manor, 2015) و دارویی (۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) بر اختلالات درون‌ریز مولدین نر ماهی قرمز با سنجش غیرمستقیم ویتلوژنین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری

در این آزمایش ابتدا تعداد ۸۰ قطعه ماهی قرمز هم‌اندازه با وزن تقریبی ۹±۵۶ گرم جهت انجام مراحل آزمایش از مرکز تکثیر ماهیان زینتی در استان کردستان تهیه و به آزمایشگاه بیولوژی دانشکده منابع طبیعی- دانشگاه کردستان منتقل شدند. ماهیان پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید در مخازن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری، به تعداد ۲۰ عدد در هر ونیرو (۴۰۰ لیتری، استوانه‌ای شکل و مجهز به سیستم هوادهی) معرفی شدند. آب مورداستفاده برای نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوادهی، کلرزدایی گردید. سیستم آب‌رسانی به مخازن نگهداری ماهیان متصل به آب‌لوله‌کشی شهری (شهر سنندج) بود و آب مورداستفاده قبل از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی گردید. ماهیان به مدت ۲ ماه تا زمان رسیدن به بلوغ جنسی تحت

[3] ER: Estrogenic receptor

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

پرورش در دمای ۲ ±۲۲ درجه سانتی‌گراد با شرایط نرمال پارامترهای کیفی آب، اکسیژن محلول (۲mg/l/ ۰±۷)، آمونیاک (۰/۰۱mg/l ±۰/۱۲)، نیتریت (۰/۲ mg/l)، سختی (۱۸۴/۶±۱۵/۱mg/l) و pH (۸/۲±۰/۳) و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. ماهیان در این مدت روزانه به مقدار ۳ درصد وزن بدن و در دو وعده غذایی (ساعات ۹ صبح و ۴ بعدازظهر) در روز با غذای مخصوص ماهی قرمز (انرژی- ساخت کشور تایلند) حاوی: ۳۳/۷۱ درصد پروتئین خام، ۸/۴۱ درصد چربی خام، ۹/۲۱ درصد خاکستر و ۲/۹۲ درصد فیبر خام تغذیه شدند (Bagheri *et al.*,2013)

طراحی آزمایش

در ابتدای فصل بهار و در مرحله بلوغ رسیدگی جنسی، مولدین نر و ماده از یکدیگر جدا شدند. تشخیص مولدین نر و ماده با مشاهده علائم خارجی رسیدگی جنسی صورت گرفت. به‌گونه‌ای که تشخیص مولدین نر بالغ از طریق فشار به ناحیه شکمی و خارج شدن اسپرم و همچنین وجود دانه‌های زبر و مرواریدی شکل روی سرپوش آبششی و قسمت فوقانی باله سینه‌ای صورت گرفت. درصورتی‌که مولدین رسیده ماده واجد شکم نرم و برآمده بودند. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل، مولدین نر به‌صورت جداگانه به ۴ تیمار (با رعایت ۲ تکرار برای هر تیمار و در هر تکرار ۱۰ عدد مولد نر) تقسیم شدند. در شروع آزمایش، جنستئین (Sigma, St Louis, MO, USA) و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) (Sigma, St Louis, MO, USA) حل و سپس به نسبت ۱:۳ با روغن ذرت رقیق شدند (Cleveland and Manor, 2015). در ادامه مولدین نر ماهی قرمز تحت تزریق دو غلظت از جنستئین و یک غلظت از هورمون ۱۷ بتا-استرادیول قرار گرفتند که به شرح ذیل می‌باشد. تیمار اول (گروه کنترل منفی): تزریق ۱۰ میکروگرم روغن ذرت و DMSO به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد. تیمار دوم (گروه کنترل مثبت، E2): تزریق ۱۰ میکروگرم هورمون ۱۷ بتا-استردیول به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد. تیمار سوم (G5): تزریق ۵ میکروگرم جنستئین به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد (به‌عنوان میزان دوز موجود در جیره‌های غذایی ماهی). تیمار چهارم (G50): تزریق ۵۰ میکروگرم جنستئین به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد (به‌عنوان دوز دارویی). تزریق ماهیان هر یک روز در میان به مدت ۱۰ روز قبل از اسپرم‌گیری از ماهیان انجام شد (Zhang *et al*., 2002; Cleveland and Manor, 2015).

در پایان دوره آزمایش یعنی ۱۰ روز پس از اولین تزریق ماهیان با پودر گل میخک به میزان ۱۵۰ppm بی‌هوش شدند. در ادامه خون‌گیری از ماهیان هر تیمار (۲۰ عدد ماهی در هر تیمار) انجام شد. خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان به‌منظور اندازه‌گیری استروئید جنسی (۱۷ بتا-استرادیول)، شاخص‌های بیوشیمیایی (کلسیم، فسفر، تریگلیسرید) و آنزیمی (آلکالین-فسفاتاز) سرم خون صورت گرفت. دو ساعت پس از لخته شدن نمونه‌های خون، با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (eppendorf 5810 R, Germany) (در دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سرم از خون جدا شد (Zadmajid, 2016). سپس سرم به ویال‌هایی که مشخصات مربوط به ماهی و مرحله آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شده بود، انتقال یافت و ویال یادشده توسط پارافیلم و درب پلاستیکی بسته در دمای زیر انجماد (۲۱- درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای موردنظر جهت سنجش ویتلوژنین

به‌منظور سنجش غیرمستقیم ویتلوژنین، غلظت آلکالین فسفاتاز و شاخص‌های بیوشیمیایی کلسیم، فسفر و تریگلیسرید سرم خون، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (SECOMA, NorthStar, Scientific Ltd; 229 UK) و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (Pars Azmun Co. Ltd., Tehran, Iran) مطابق با روش کار پیشنهادشده کارخانه مربوطه (با رعایت ۳ تکرار در هر اندازه‌گیری) مورد سنجش قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری مقدار هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون نیز از کیت‌های IBL الایزا (IBL International GmbH, Germany) استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

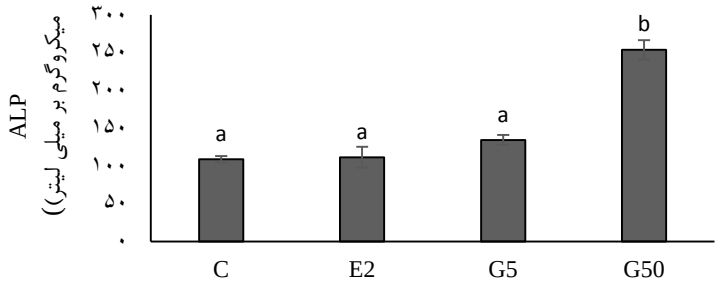
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

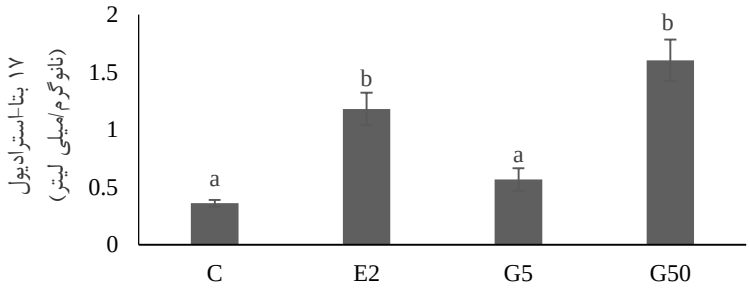
داده‌ها پس از کنترل همگنی آن‌ها به‌وسیله آزمون لون[4] توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون توکی[5] در سطح ۹۵ درصد (α= ۰/۰۵)، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. بررسی کلیه داده‌ها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS (SPSS 16, Chicago, IL) انجام و داده‌ها در نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد (Mean ± S.E) بیان شده است. آنالیز رگرسیون خطی ساده جهت تعیین معنی‌داری ارتباط میان مقادیر ALP با سطوح کلسیم، فسفر، تریگلیسرید و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول انجام پذیرفت.

نتایــج

مطابق شکل ۱ پس از تزریق جنستئین سطح ALP سرم خون مولدین نر ماهی قرمز در کوتاه‌مدت افزایش یافت هرچند که این افزایش تنها در استفاده از دوز دارویی جنستئین معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و سطح ALP مولدین نر تیمارشده با هورمون ۱۷ بتا- استرادیول تغییر معنی‌داری را نشان نداد. هرچند که تأثیرات استروژنیک تیمارهای E2 و G50 با افزایش معنی‌دار سطح هورمون ۱۷ بتا- استرادیول سرم خون مولدین نر ماهی قرمز به اثبات رسید (شکل ۲).



شکل ۱. غلظت آلکالین فسفاتاز در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز پس از مواجه با دو دوز جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد). گروه کنترل منفی (C)، گروه کنترل مثبت (E2)، ۵ میکروگرم بر گرم جنستئین (G5)، ۵۰ میکروگرم بر گرم جنستئین (G50).



شکل ۲. غلظت هورمون ۱۷ بتا-استرادیول در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز پس از مواجه با دو دوز جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد). گروه کنترل منفی (C)، گروه کنترل مثبت (E2)، ۵ میکروگرم بر گرم جنستئین (G5)، ۵۰ میکروگرم بر گرم جنستئین (G50).

تعدادی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون (کلسیم، فسفر و تریگلیسرید) که ارتباط نزدیکی با افزایش سطح ویتلوژنین پلاسما در ماهیان دارند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. به گونه‌ای که این شاخص‌ها بر روی مولدین نر تیمار شده با جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تنها در غلظت دارویی جنستئین (G50) و E2 شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون تغییر می‌یابند. به‌گونه‌ای که در جنس نر ماهی قرمز سطح فسفر و تریگلیسرید سرم خون در تیمارهای G50 و E2 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) بااین‌حال تفاوت معنی‌داری در سطوح کلسیم سرم خون بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همچنین آزمون تجزیه رگرسیون نشان داد که بین غلظت ALP و E2 یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵) (شکل ۳). علاوه بر این ALP و غلظت‌های فسفر و تریگلیسرید نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۴ و ۶). بااین‌حال همبستگی ALP و غلظت‌های کلسیم معنی‌دار نبود (شکل ۵).

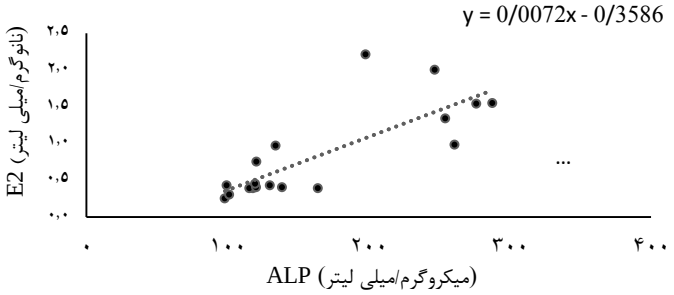
[4] Levene's tests
[5] Tukey's test

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

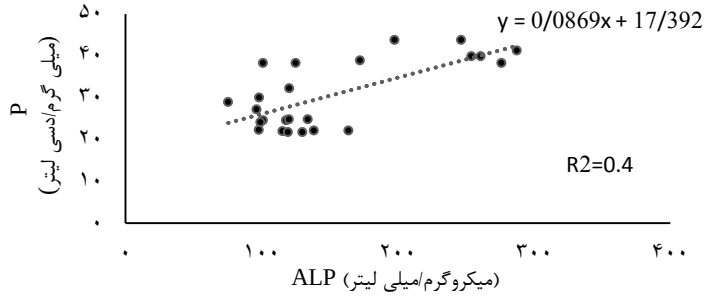
جدول ۱. شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهیان مورد آزمایش (میانگین±خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ۴ (G50)
کلسیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۸/۰۸±۰/۵۳[a]	۱۸/۸۶±۰/۱۶[a]	۱۷/۵۷±۰/۷۰[a]	۱۸/۶۰±۰/۳۸[a]
فسفر (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۲۳/۷۰±۰/۵۱[a]	۳۳/۵۶±۲/۲۲[b]	۱۷/۵۷±۰/۷۰[a]	۴۱/۱۳±۰/۹۲[c]
تریگلیسرید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۲۰۷/۸۵±۳/۲۰[a]	۲۳۶/۷۷±۲/۹۶[b]	۲۱۸/۵۴±۲/۷۴[a]	۲۶۷/۳۶±۲/۶۶[c]

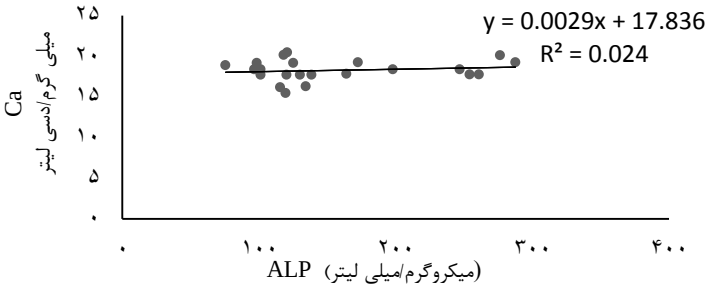
حروف انگلیسی مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی می‌باشد (P>۰/۰۵). گروه کنترل منفی (C)، گروه کنترل مثبت (E2)، ۵ میکروگرم بر گرم جنستئین (G5)، ۵۰ میکروگرم بر گرم جنستئین (G50).



شکل ۳. نمودار ارتباط میان غلظت‌های ALP و E2 سرم خون مولدین نر تیمار شده با جنستئین (P<۰/۰۵).



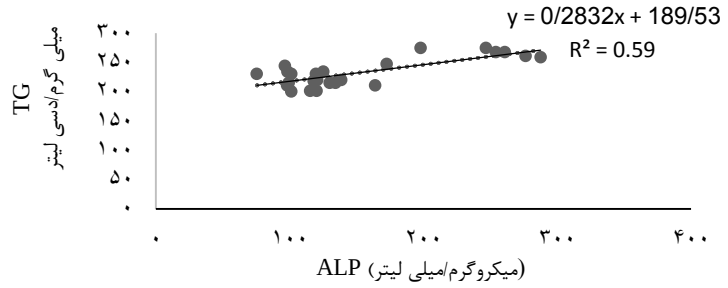
شکل ۴. نمودار ارتباط میان غلظت‌های ALP و فسفر سرم خون مولدین تیمار شده با جنستئین و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول (P<۰/۰۵).



شکل ۵. همبستگی میان غلظت‌های آلکالین فسفاتاز و کلسیم سرم خون مولدین تیمار شده با جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (P>۰/۵).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]



شکل ۶. نمودار ارتباط میان غلظت آلکالین فسفاتاز و تری‌گلیسرید سرم خون مولدین نر تیمارشده با جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (P<۰/۰۵).

بحث

ویتلوژنین یک گلیکوفسفولیپوپروتئین است که در کبد ماهیان ماده و تحت کنترل هورمون ۱۷ بتا-استرادیول تولید می‌شود (Tufail and Takeda, 2008). هرچند که در شرایط طبیعی این پروتئین در جنس ماده ساخته می‌شود اما ماهیان نر و نابالغ‌ها نیز دارای گیرنده‌های استروژنیک کبدی بوده و سنتز ویتلوژنین در آن‌ها، زمانی که در معرض ترکیبات استروژنیک قرار می‌گیرند، اتفاق می‌افتد (Kime *et al*., 1999). بنابراین ویتلوژنین به‌عنوان یک نشانگر زیستی مناسب جهت ارزیابی آلاینده‌های اخلال‌گر سیستم درون‌ریز استفاده می‌شود (Matozzo *et al*., 2008). در سال ۲۰۰۲، Kang و همکاران گزارش کردند که تخریب سیستم غدد درون‌ریز در ماهیان نر بالغ مداکا (*Oryzias latipes*) با القاء ویتلوژنین و ایجاد گنادهای بین جنسی درنتیجه‌ی تماس با غلظت‌های مختلف هورمون ۱۷ بتا-استرادیول ایجاد می‌گردد. اثرات شبه استروژنیک جنستئین به‌عنوان مختل‌کننده غدد درون‌ریز در ماهیان به اثبات رسیده است. محققان افزایش سطح ویتلوژنین را به‌عنوان یک شاخص فعالیت استروژنیک در ماهیانی که در معرض جنستئین بوده‌اند را نشان داده‌اند (Kausch *et al*., 2007) . در مطالعه‌ای تأثیرات استروژنیک ۱۷ بتا-استرادیول و جنستئین را روی بیان ژن ویتلوژنین (vtg1) در ماهی گورخری بالغ (*Danio rerio*) بررسی کردند. مطالعات این پژوهشگران مشخص کرد که بیان ژن ویتلوژنین در کبد ماهی نر در غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر لیتر استرادیول و ۵۰۰۰ میکروگرم بر لیتر جنستئین شروع می‌شود. زمانی که ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز از جیره‌های حاوی جنستئین به مدت یک سال تغذیه کرده بودند، سنتز ویتلوژنین در هر دو جنس از ماهیان القاء گردید و منجر به کاهش غلظت و تحرک اسپرم در زمان تخم‌ریزی شد (Bennetau-Pelissero *et al*., 2001). در مطالعه‌ای دیگر نیز مشخص شد که تماس ماهیان قرمز بالغ نر با غلظت‌های بالای دو فیتواستروژن جنستئین و دایدزئین[6] منجر به القای شدید ویتلوژنین و کاهش سطح هورمون تستوسترون و ۱۱- کتوتستوسترون می‌شود (Ishibashi *et al*., 2004). نتایج این مطالعه نشان داد تماس کوتاه‌مدت مولدین نر ماهی قرمز با دوز دارویی جنستئین (۵۰ میکروگرم/گرم) منجر به افزایش غلظت آلکالین فسفاتاز (ALP) سرم خون می‌گردد. در بسیاری از مطالعات مشخص شده است که می‌توان با استفاده از شاخص ALP به حضور ویتلوژنین در پلاسمای ماهیان پی برد (Burzawa-Gerard, 1991; Kramer *et al*., 1998)؛ چراکه تنها پروتئین حاوی فسفات در خون مهره‌داران تخم‌گذار متعلق به ویتلوژنین است (Christensen *et al*., 1999) و این عامل همراه با درجه‌ی بالای فسفری شدن، سنجش غیرمستقیم ویتلوژنین را از طریق آلکالین فسفاتاز (ALP) امکان‌پذیر می‌سازد (Hallgren *et al*., 2009). به‌طور مثال افزایش معنی‌دار غلظت ALP پلاسمای خون ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) با افزایش غلظت هورمون ۱۷ بتا-استرادیول پلاسما ارتباط مستقیمی را نشان داده است (Kramer *et al*., 1998). در یک بررسی نیز مشخص شد که افزایش معنی‌دار سطوح ALP پلاسما مبین سنتز کبدی ویتلوژنین در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) تیمار شده با ترکیبات استروژنیک ۴-نونیل فنل می‌باشد (Naderi *et al*., 2014). در این مطالعه نیز غلظت ALP در تیمار G50 افزایش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). بااین‌وجود، سنتز ویتلوژنین در دوز پایین (۵ میکروگرم/گرم) جنستئین قابل‌توجه نبود (P>۰/۰۵). همچنین در این بررسی مشخص شد که سطح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون در مولدین نر تیمار شده با

[6] Daidzein

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

۱۰ میکروگرم/گرم E2 و ۵۰ میکروگرم/گرم جنستئین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری با سطوح ALP سرم خون مولدین تیمار شده با ۵۰ میکروگرم/گرم جنستئین وجود داشت (R^2= ۰/۶۲۳۹) (P<۰/۰۵). این نتایج می‌تواند تأثیرات استروژنیک جنستئین را در القای ویتلوژنین مولدین نر ماهی قرمز تحت تیمار تأیید کند. ویتلوژنین یک ترکیب فسفولیپوپروتئینی است، بنابراین افزایش آن می‌تواند باعث افزایش هر یک از اجزا تشکیل‌دهنده ماده مذکور شود. در مطالعه حاضر نیز چند ترکیب فسفر، کلسیم و تریگلیسرید که ارتباط تنگاتنگی با افزایش سطح ویتلوژنین پلاسما در ماهیان دارند، اندازه‌گیری و رابطه بین غلظت آن‌ها با سطوح ALP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح کلسیم سرم خون در هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نمی‌یابد و رابطه‌ی معنی‌داری با سطوح ALP نشان نداد. محققان بیان کرده‌اند که در زمان سنتز ویتلوژنین مقادیر زیادی از کلسیم به درون پروتئین انتقال می‌یابد (Gillespie and Peyster, 2004) این کلسیم‌های باند شده به ویتلوژنین در جهت افزایش حلالیت این پروتئین بزرگ در خون می‌باشند (Follett and Redshaw, 1974). پژوهشگران در چندین بررسی افزایش هم‌زمان کلسیم و غلظت ویتلوژنین پلاسما را به دنبال تحریک استروژنی نشان داده‌اند (Carragher and Sumpter, 1991; Bjornsson and Haux, 1985). اما در مطالعه حاضر تغییری در سطح کلسیم سرم توسط این ترکیبات استروژنیک ایجاد نگردید. این احتمال وجود دارد که سیستم فیزیولوژی ماهی قرمز در این مرحله از رسیدگی جنسی نسبت به تماس با دوزهای E2 و یا شبه استروژن جنستئین، جهت تغییر در غلظت کلسیم سرم خون حساس نیست. در ماهیان، فسفات یک ترکیب مهم در ویتلوژنین به‌حساب می‌آید (Mommsen and Walsh, 1998). مطالعه حاضر مشخص کرد که سطح فسفر سرم خون در تیمارهای E2 و G50 نسبت به گروه کنترل و G5 افزایش معنی‌داری می‌یابد و رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری با سطوح ALP را نشان داد (R^2=۰/۴۸۴۵) (P<۰/۰۵). این نتایج بیان‌کننده آن است که E2 و جنستئین ممکن است اثرات استروژنیک را در مولدین نر ماهی قرمز اعمال کنند. مطالعات در پستانداران نشان داده است که هورمون ۱۷ بتا-استرادیول و یا استروژن‌های شیمیایی توانایی مداخله در میزان لیپیدهای موجود در بدن را دارند (Aftergood and Slater, 1965; Schaefer *et al*., 1983; Bertolotti and spady, 1996). در این تحقیق افزایش معنی‌داری در میزان تریگلیسرید سرم خون ماهیان قرمز در تیمارهای E2 و G50 مشاهده شد؛ که نشان‌دهنده‌ی تأثیرات هورمون ۱۷ بتا-استرادیول بر روی مقدار چربی پلاسما و همچنین تأثیرات شبه استروژنی جنستئین در دوزهای بالا، بر روی ماهی قرمز است. Cleveland و Manor (2015)، در مطالعه‌ای نشان دادند که جنستئین در تنظیم مسیرهای متابولیسم چربی دخالت دارد. به‌گونه‌ای که تزریق ۵۰ میکروگرم/گرم جنستیئن و ۵ میکروگرم/گرم E2 در ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن آنزیم‌های سنتز اسیدهای چرب و تریگلیسرول نسبت به گروه کنترل‌شده و همچنین منجر به بیان ژن ویتلوژنین در این ماهیان می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر نیز مشخص شد که یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری بین غلظت تریگلیسرید و سطوح ALP سرم خون ایجاد می‌گردد (R^2=۰/۵۹) (P<۰/۰۵) که می‌تواند عاملی در تأیید اثرات استروژنیک غلظت‌های بالای جنستئین جهت القای ویتلوژنین در مولدین نر ماهی قرمز باشد. بااین‌حال محققان نیز مشخص کرده‌اند که میزان توانایی جنستئین در بیان ژن استروژن با توجه به جنس، گونه، میزان دوز و مدت‌زمان در تماس، متفاوت است (Latonnelle *et al*., 2000; Zhang *et al*., 2002).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد زمانی که مولدین نر ماهی قرمز در معرض دوزهای بالای جنستئین قرار می‌گیرند نشانه‌هایی از القای ویتلوژنین در آن‌ها پدیدار می‌شود. این تأثیرات استروژنیک جنستئین در القای ویتلوژنین با افزایش سطوح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون ماهیان تیمارشده با دوزهای بالای جنستئین و ۱۷ بتا-استرادیول مورد تأیید قرار می‌گیرد. همچنین نتایج این بررسی مشخص کرد که استفاده از دوزهای خوراکی جنستئین، تأثیری منفی بر عملکرد سیستم درون‌ریز ماهیان تیمار شده نمی‌گذارد؛ بنابراین باید از عدم تماس مولدین نر ماهی قرمز با غلظت‌های بالای جنستئین به‌منظور عدم ایجاد اختلال در سیستم درون‌ریز ماهیان نر و موفقیت در تولیدمثل اطمینان حاصل نمود.

منابـع

Aftergood, L., Alfin-Slater, R.B. 1965. Dietary and gonadal hormone effects on lipid metabolism in the rat. Journal of Lipid Research. 6: 287-294.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

Bagheri, T., Imanpoorb, M.R., Jafarib, V., Bennetau-Pelissero, C. 2013. Reproductive impairment and endocrine disruption ingoldfish by feeding diets containing soybean meal. Animal Reproduction Science. 139: 136-144.

Bennetau-Pelissero, C., Breton, B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B. 2001. Effect of genistein-enriched diets n the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comaparative Endocrinology. 121: 173-187.

Bertolotti, M., Spady, D. 1996. Effect of hypocholesterolemic doses of 17 alpha-ethinyl estradiol on cholesterol balance in liver and extrahepatic issues. Journal of Lipid Reserch. 37: 1812-1822.

Bjornsson, B.T., Haux, C. 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17β treated rainbow trout. Jornal of Comparative Physiology. 155: 347-352.

Burzawa-Gerard, E., Dumas-Vidal, A. 1991. Effects of 17β-estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized European silver eel (*Anguilla anguilla*) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. General Comparative Endocrinology. 84: 264-276.

Carragher, J.F., Sumpter, J.P. 1991. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. Comparative Biochemistry and Physiology. 99: 169-172.

Christensen, L.J., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder (*Platichthys flesus*). Aquatic Toxicology. 46: 211-219.

Cleveland, B.M., Manor, M.L. 2015. Effects of phytoestrogens on growth-related and lipogenic genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology.170: 28-37.

Dixon, R.A., Ferreir, D. 2002. Genistein. Phytochemistry. 60: 205-211.

Follett, B.K., Redshaw, M.R. 1974. The physiology of vitellogenesis. In: Lofts, B. (ed.). Physiology of the Amphibia. Academic Press. New York. pp: 219-308.

Gatlin III, D.M., Barrows, F., Brown, T., Dabrowski, P., Gaylord, K., Hardy,T.G., Herman, R.W., Hu, E., Krogdahl, G., Nelson, A., Overturf, R., Rust,K., Sealey, M., Skonberg, W., Souza, D., Stone, E.J., Wilson, D., Wurtele, R.E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products inaquafeeds: a review. Aquaculture Research. 38: 551-579.

Gillespie, D.K., Peyster, A.D. 2004. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 58: 90-95.

Green, C.C., Kelly, A.M. 2008. Effect of the exogenous soyabean phyto-oestrogen genistein on sperm quality, ATP content and fertilization rates in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) and walleye *Sander vitreus* (Mitchill). Journal of Fish Biology. 72: 2485-2499.

Green, C., Kelly, A. 2009. Effects of the estrogen mimic genistein as a dietary component on sex differentiation and ethoxyresorufin-odeethylase (EROD) activity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish Physiology and Biochemistry. 35: 377-384.

Hallgren, P., Martensson, A., Mathiasson, L. 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin via alkali-labile phosphate in fish plasma-a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. International Journal of of Environmental Analytical Chemistry. 89: 1023-1042.

Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Tatarazako, N., Matsumura, N., Tomiyasu, Y., Tominaga, N., Arizono, K. 2004. Effects of nonylphenol and phytoestrogen-enriched diet on plasma vitellogenin, steroid hormone, hepatic cytochrome P4501A, and glutathione-S-transferase values in goldfish (*Carassius auratus*). Comparative Medicine. 54: 54-62.

Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T. 2002. Effect of 17β-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere. 47: 71-80.

Kausch, U., Alberti, M., Haindl, S., Budczies, J., Hock, B. 2007. Biomarkers for exposure to estrogenic Compounds: gene expression analysis in Zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology. 23: 15-24.

Kime, D., Nash, J., Scott, A. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. Aquaculture. 177: 345-352.

Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]

estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 133: 257-274.

Knight, D.C., Eden J.A. 1995. Phytoestrogens — a short review. Maturitas. 22: 167-175.

Kramer, V.J., Richardson, S.M., Pierens, S.L., Giesy, J.P. 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17β-estradiol. Aquatic Toxicology. 40: 335-360.

Latonnelle, K., Le Mennm, F., Bennetau-Pelissero, C. 2000. In vitro estrogenic effects of phytoestrogens in rainbow trout and Siberian sturgeon. Ecotoxicology. 9: 115-125.

Matozzo, V., Gagne, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. Environment International. 34(4): 531-45.

Mommsen, T.P., Walsh, P.J. 1998. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., (eds.). Fish Physiology. The physiology of developing fish. Part A: Eggs and larvae, vol. XI. Academic Press. New York, USA. pp. 347-406.

Naderi, M., Safahieh, A.R., Dehghan Madiseh, S., Zolgharnin, H., Rajabzade Ghatrami, E., Eidivand, S. 2014. The estrogenic effect of 4-nonylphenol on vitellogenin synthesis in the immature male yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Teleostei: Sparidae) (Houttuyn, 1782). Journal of Research Animals (Journal of Biology Iran). 1(27): 143-154. (in Persian).

Nagao, T., Shinsuke, Y., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H. 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. Reproductive Toxicology. 15: 399-411.

Ng, Y., Hanson, S., Malison, J.A., Wentworth, B., Barry, T.P. 2006. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. Aquaculture. 254: 658-665.

Noble, E., Demaël, A., Garin, D., Moulin, C., Barré, H. 1998. Effects of a hypoproteic soybean based diet on the energy stores and growth of carp, *Cyprinus carpio*. Comparative Biochemistery and Physiology. 120: 157-161.

Pollack, S.J., Ottinger, M.A., Sullivan, C.V., Woods, L.C. 2003. The effects of the soy isoflavone genistein on the reproductive development of striped bass. North American Journal of Aquaculture. 65: 226-234.

Schaefer, E.J., Foster, D.M., Zech, L.A., Lindgren, F.T., Brewer, H.B.J., Levy, R.I. 1983. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 57: 262-267.

Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R.R., Elvebo, O. 2010. Effects of dietary yeast cell wall beta-glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo sala*r) fed sunflower and soybean meal. Aquaculture. 305: 109-116.

Tufail, M., Takeda, M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. Journal of Insect Physiology. 54: 1447-1458.

Wheeler, J.R., Gimeno, S., Crane, M., Lopez-Juez, E., Morritt, D. 2005. Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. Toxicology Mechanisms and Methods. 15(4): 293-306.

Zadmajid, V. 2016. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa + domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). Aquaculture. 463: 7-15.

Zhang, L., Ikhlas, A., Foran, C.M. 2002. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Comparative Biochemistry and Physiology. 132: 203-211.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-12-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.7.4.9.4]