



اثر استروژنیک جنسیتین بر القای زرده سازی در جنس نر مولدین ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

الهام نظافتیان^{*}، وحید زادمجید

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در مطالعه‌ی حاضر اثر استروژنیک جنسیتین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول بر ساخت ویتلوژنین مولدین نر ماهی قرمز (<i>Carassius auratus</i>) مورد مطالعه قرار گرفت. ماهیان مولد نر با ۵ میکروگرم بر گرم (G5) و ۵۰ میکروگرم بر گرم جنسیتین (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 به صورت غیرمستقیم با اندازه‌گیری ALP، هورمون ۱۷ بتا-استرادیول و شاخص‌های بیوشیمیایی کلسیم، فسفر و تریگلیسرید به‌عنوان نمایندگان ویتلوژنین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح ALP سرم خون ماهیان تیمار شده با (G50) جنسیتین 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 ($P < 0.05$). با این حال همبستگی بین ALP و غلظت‌های کلسیم معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). نتایج نشان می‌دهد که دوزهای بالای جنسیتین با افزایش سطح ALP سرم خون موجب تحریک سنتز ویتلوژنین می‌شود که این موضوع با وجود یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌دار بین غلظت ALP و فسفر و کلسترول و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول مورد تأیید قرار می‌گیرد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۵/۰۸/۲۱ اصلاح: ۹۶/۰۴/۰۲ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۶	
کلمات کلیدی: ۱۷ بتا-استرادیول جنسیتین ماهی قرمز ویتلوژنین	

مقدمه

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 این صورت تعریف می‌شوند که از نظر ساختمان و عمل شبیه ۱۷ بتا-استرادیول (E2) می‌باشند و یا این که اثراتی شبیه استروژن را ایجاد می‌نمایند (Knight et al., 1995). اصلی‌ترین گروه فیتواستروژن‌ها ایزوفلاون‌ها هستند که تقریباً به‌طور اختصاصی در خانواده نخودیان^۱ یافت می‌شوند. گیاه سویا که از خانواده نخود است و یکی از منابع غنی از ایزوفلاون‌ها به شمار می‌رود. جنسیتین^۲ فراوان‌ترین و بیش‌ترین فعالیت بیولوژیکی را در میان ایزوفلاون‌های سویا دارا می‌باشد (Pollack et al., 2003). جنسیتین دارای یک ساختمان دی‌فنول است که شباهت نزدیکی با ساختار هورمون ۱۷ بتا-استرادیول دارد (Ng et al., 2006)، این ویژگی، جنسیتین را قادر می‌سازد تا به

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

¹ Leguminosae

² Genestein

گیرنده‌های استروژنیک^۳ (ER) اتصال یابد (Dixon and Ferreira, 2002). جنسیتین 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 از جمله ماهیان فرآیندی معمول است. با این وجود 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). در واقع یکی از عملکردهای ایزوفلاون جنسیتین توانایی تأثیر بر پروتئین‌های گیرنده هورمون‌های جنسی و تأثیر بر روی تنظیم استروئیدوز و مقدار هورمون‌های در گردش است (Gatlin et al., 2007) که باعث ایجاد تأثیرات مخرب بر سیستم تولیدمثلی حیوانات (Nagao et al., 2001) از جمله ماهیان می‌شود. به‌عنوان مثال افزایش قابل توجهی از سطح ویتلوژنین سرم خون در ماهیان باس راه‌راه تحت تماس با غلظت‌های مختلف جنسیتین 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 جنسیتین موجب القاء ویتلوژنین و کاهش غلظت و تحرک اسپرم در زمان تخم‌ریزی می‌شود. برخی از مطالعات دیگر نیز حاکی از آن است که جنسیتین 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 قرار گرفته است و در حال حاضر تا حدی جایگزین پودر ماهی بدون تأثیرات منفی بر عملکرد رشد ماهیان شناخته شده است (Noble et al., 1998; Kaushik et al., 1995; Refstie et al., 2010) از طرفی، جنسیتین 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 جنسیتین 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 9 ± 56 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 مورد استفاده برای نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوادهی، کلرزایی گردید. سیستم آبرسانی به مخازن نگهداری ماهیان متصل به آب‌لوله‌کشی شهری (شهر سنندج) بود و آب مورد استفاده قبل از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزایی و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی گردید. ماهیان به مدت ۲ ماه تا زمان رسیدن به بلوغ جنسی تحت

³ ER: Estrogenic receptor

پرورش در دمای 2 ± 22 درجه سانتی‌گراد با شرایط نرمال پارامترهای کیفی آب، اکسیژن محلول ($1/2 \pm 0.7$)، آمونیاک ($1 \text{ mg/l} \pm 0.12$)، نیتريت (2 mg/l)، سختی ($1 \text{ mg/l} \pm 15/6 \pm 184$) و pH ($3 \pm 0.2/8$) 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. در صورتی که 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، جنسیتین (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 جنسیتین و یک غلظت از هورمون ۱۷ بتا-استرادیول قرار گرفتند که به شرح ذیل می‌باشد. تیمار اول (گروه کنترل منفی): تزریق 10^0 میکروگرم روغن ذرت و DMSO به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد. تیمار دوم (گروه کنترل مثبت، E2): تزریق 10^0 میکروگرم هورمون ۱۷ بتا-استرادیول به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد. تیمار سوم (G5): تزریق 5^0 میکروگرم جنسیتین به ازای گرم وزن بدن ماهیان مولد (به‌عنوان میزان دوز موجود در جیره‌های غذایی ماهی). تیمار چهارم (G50): تزریق 5^0 میکروگرم جنسیتین 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 150 ppm 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 3000 g به مدت ۱۵ دقیقه و دمای 4 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 پارافیلیم و درب پلاستیکی بسته در دمای زیر انجماد (-21 - درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای موردنظر جهت سنجش ویتلوژنین

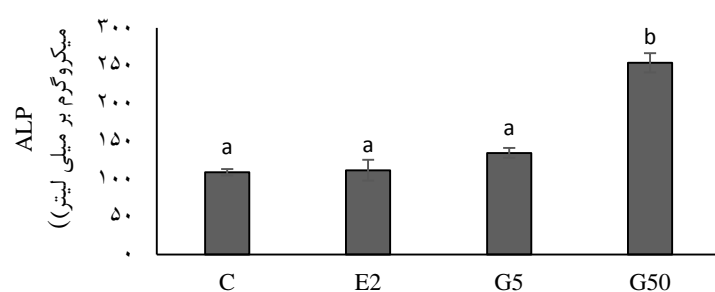
به‌منظور سنجش غیرمستقیم ویتلوژنین، غلظت آلکالین فسفاتاز و شاخص‌های بیوشیمیایی کلسیم، فسفر و تریگلیسرید سرم خون، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (SECOMA, NorthStar, Scientific Ltd; 229 UK) و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (Pars Azmun Co. Ltd., Tehran, Iran) مطابق با روش کار پیشنهادشده کارخانه مربوطه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

تجزیه و تحلیل آماری

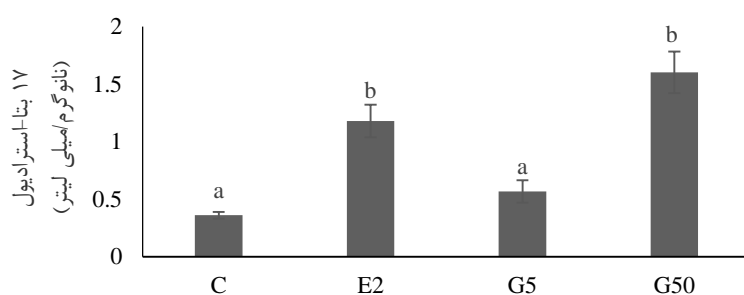
داده‌ها پس از کنترل همگنی آن‌ها به وسیله آزمون لون^۴ توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون توکی^۵ در سطح ۹۵ درصد ($\alpha = 0/05$)، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی کلیه داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS (SPSS 16, Chicago, IL) انجام و داده‌ها در نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm S.E) بیان شده است. آنالیز رگرسیون خطی ساده جهت تعیین معنی داری ارتباط میان مقادیر ALP با سطوح کلسیم، فسفر، تریگلیسرید و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول انجام پذیرفت.

نتایج

مطابق شکل ۱ پس از تزریق جنستین سطح ALP سرم خون مولدین نر ماهی قرمز در کوتاه مدت افزایش یافت هر چند که این افزایش تنها در استفاده از دوز دارویی جنستین معنی دار بود ($P < 0/05$) و سطح ALP مولدین نر تیمار شده با هورمون ۱۷ بتا-استرادیول تغییر معنی داری را نشان نداد. هر چند که تأثیرات استروژنیک تیمارهای E2 و G50 با افزایش معنی دار 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 مواجهه با دو دوز جنستین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می باشد). گروه کنترل منفی (C)، گروه کنترل مثبت (E2)، ۵ میکروگرم بر گرم جنستین (G5)، ۵۰ میکروگرم بر گرم جنستین (G50).



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

تعدادی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون (کلسیم، فسفر و تریگلیسرید) که ارتباط نزدیکی با افزایش سطح ویتلوژنین پلازما در ماهیان دارند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. به گونه‌ای که این شاخص‌ها بر روی مولدین نر تیمار شده با جنستین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تنها در غلظت دارویی جنستین (G50) و E2 شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون تغییر می‌یابند. به گونه‌ای که در جنس نر ماهی قرمز سطح فسفر و تریگلیسرید سرم خون در تیمارهای G50 و E2 به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$) باین حال تفاوت معنی داری در سطوح کلسیم سرم خون بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0/05$). همچنین آزمون تجزیه رگرسیون نشان داد که بین غلظت ALP و E2 یک رابطه مثبت و معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$) (شکل ۳). علاوه بر این ALP و غلظت‌های فسفر و تریگلیسرید نیز همبستگی مثبت و معنی داری را نشان دادند (شکل ۴ و ۶). باین حال همبستگی ALP و غلظت‌های کلسیم معنی دار نبود (شکل ۵).

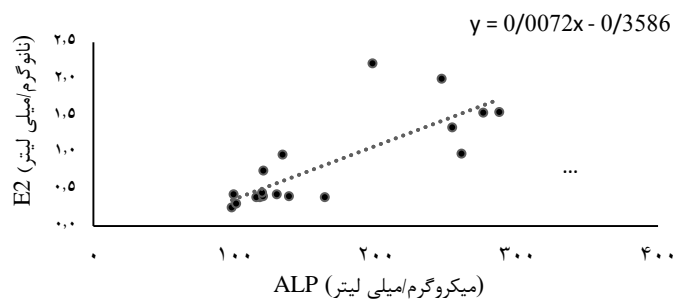
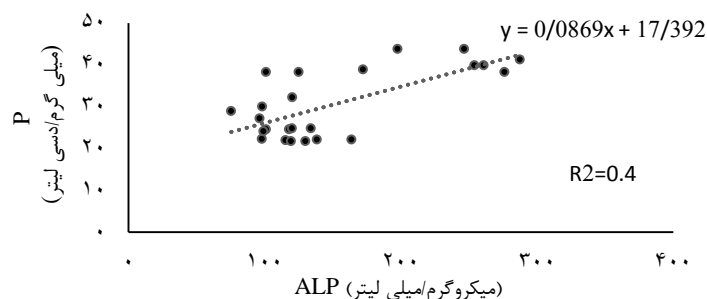
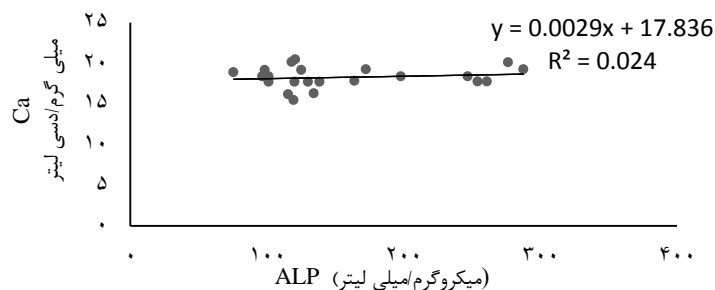
⁴ Levene's tests

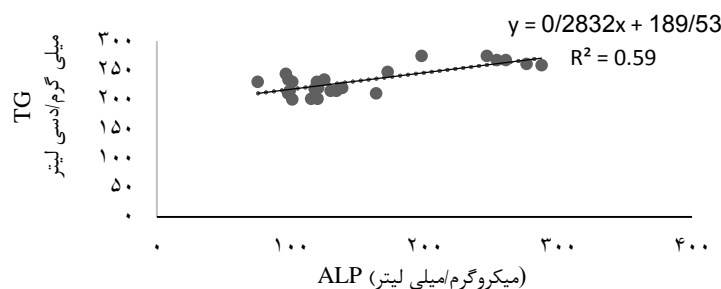
⁵ Tukey's test

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 (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۸/۰۸ ± ۰/۵۳ ^a	۱۸/۸۶ ± ۰/۱۶ ^a	۱۷/۵۷ ± ۰/۷۰ ^a	۱۸/۶۰ ± ۰/۳۸ ^a
فسفر (میلی گرم/دسی لیتر)	۲۳/۷۰ ± ۰/۵۱ ^a	۳۳/۵۶ ± ۲/۲۲ ^b	۱۷/۵۷ ± ۰/۷۰ ^a	۴۱/۱۳ ± ۰/۹۲ ^c
تریگلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)	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 ($P > 0.05$). 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 ($P < 0.05$).شکل ۴. نمودار ارتباط میان غلظت‌های ALP و فسفر سرم خون مولدین تیمار شده با جنس‌تئین و هورمون ۱۷-بتا-استرادیول ($P < 0.05$).شکل ۵. همبستگی میان غلظت‌های آلکالین فسفاتاز و کلسیم سرم خون مولدین تیمار شده با جنس‌تئین و هورمون ۱۷-بتا-استرادیول ($P > 0.05$).



شکل ۶. نمودار ارتباط میان غلظت آلکالین فسفاتاز و تری گلیسرید سرم خون مولدین نر تیمار شده با جنستین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول ($P < 0/05$).

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 اخلاص گر 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 گندهای بین جنسی در نتیجه‌ی تماس با غلظت‌های مختلف هورمون ۱۷ بتا-استرادیول ایجاد می‌گردد. اثرات شبه استروژنیک جنستین 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 جنستین بوده‌اند را نشان داده‌اند (Kausch *et al.*, 2007). در مطالعه‌ی تأثیرات استروژنیک ۱۷ بتا-استرادیول و جنستین 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 جنستین شروع می‌شود. زمانی که ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز از جیره‌های حاوی جنستین 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 مطالعه‌ی دیگر نیز مشخص شد که تماس ماهیان قرمز بالغ نر با غلظت‌های بالای دو فیتواستروژن جنستین و دایدزئین^۶ 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 جنستین (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 پلاسمای ارتباط مستقیمی را نشان داده است (Kramer *et al.*, 1998). در یک بررسی نیز مشخص شد که افزایش معنی‌دار سطوح ALP پلاسمای 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 ($P < 0/05$). با این وجود، سنتز ویتلوژنین در دوز پایین (۵ میکروگرم/گرم) جنستین قابل‌توجه نبود ($P > 0/05$). همچنین در این بررسی مشخص شد که سطح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون در مولدین نر تیمار شده با

⁶ Daidzein

۱۰ میکروگرم/گرم E2 و ۵۰ میکروگرم/گرم جنسستین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و یک رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری با سطوح ALP سرم خون مولدین تیمار شده با ۵۰ میکروگرم/گرم جنسستین وجود داشت ($R^2=0/6239$) ($P<0/05$). این نتایج می‌تواند تأثیرات استروژنیک جنسستین را در القای ویتلوژنیز مولدین نر ماهی قرمز تحت تیمار تأیید کند. ویتلوژنیز 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 ویتلوژنیز پلازما 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 سنتر ویتلوژنیز مقادیر زیادی از کلسیم به درون پروتئین انتقال می‌یابد (Gillespie and Peyster, 2004) این کلسیم‌های باند شده به ویتلوژنیز در جهت افزایش حلالیت این پروتئین بزرگ در خون می‌باشند (Follett and Redshaw, 1974). پژوهشگران در چندین بررسی افزایش هم‌زمان کلسیم و غلظت ویتلوژنیز پلازما 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 جنسستین، جهت تغییر در غلظت کلسیم سرم خون حساس نیست. در ماهیان، فسفات یک ترکیب مهم در ویتلوژنیز به حساب 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 ($R^2=0/4845$) ($P<0/05$). این نتایج بیان‌کننده آن است که E2 و جنسستین 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). خون ماهیان قرمز در تیمارهای E2 و G50 مشاهده شد؛ که نشان‌دهنده تأثیرات هورمون ۱۷ بتا-استرادیول بر روی مقدار چربی پلازما و همچنین تأثیرات شبه استروژنی جنسستین در دوزهای بالا، بر روی ماهی قرمز است. Cleveland و Manor (2015)، در مطالعه‌ای نشان دادند که جنسستین در تنظیم مسیرهای متابولیسم چربی دخالت دارد. به‌گونه‌ای که تزریق ۵۰ میکروگرم/گرم جنسستین و ۵ میکروگرم/گرم E2 در ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن آنزیم‌های سنتز اسیدهای چرب و تریگلیسرول نسبت به گروه کنترل شده و همچنین منجر به بیان ژن ویتلوژنیز 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 ($R^2=0/59$) ($P<0/05$) که می‌تواند عاملی در تأیید اثرات استروژنیک غلظت‌های بالای جنسستین جهت القای ویتلوژنیز در مولدین نر ماهی قرمز باشد. با این حال محققان نیز مشخص کرده‌اند که میزان توانایی جنسستین 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 جنسستین قرار می‌گیرند نشانه‌هایی از القای ویتلوژنیز در آن‌ها پدیدار می‌شود. این تأثیرات استروژنیک جنسستین در القای ویتلوژنیز با افزایش سطوح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون ماهیان تیمار شده با دوزهای بالای جنسستین و ۱۷ بتا-استرادیول مورد تأیید قرار می‌گیرد. همچنین نتایج این بررسی مشخص کرد که استفاده از دوزهای خوراکی جنسستین، تأثیری منفی بر عملکرد سیستم درون‌ریز ماهیان تیمار شده نمی‌گذارد؛ بنابراین باید از عدم تماس مولدین نر ماهی قرمز با غلظت‌های بالای جنسستین به‌منظور عدم ایجاد اختلال در سیستم درون‌ریز ماهیان نر و موفقیت در تولیدمثل اطمینان حاصل نمود.

منابع

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.

- Bagheri, T., Imanpoorb, M.R., Jafarib, V., Bennetau-Pelissero, C. 2013. Reproductive impairment and endocrine disruption in goldfish 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 on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative 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 tissues. *Journal of Lipid Research*. 37: 1812-1822.
- Bjornsson, B.T., Haux, C. 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17 β treated rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*. 155: 347-352.
- Burzawa-Gerard, E., Dumas-Vidal, A. 1991. Effects of 17 β -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 rainbow trout (*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 in aquafeeds: 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 soybean 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-*o*-deethylase (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 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 17 β -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

- 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 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology*. 40: 335-360.
- Latonnelle, K., Le Menm, 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 Biochemistry 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 salar*) 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™ (sGnRH α + domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scaper, *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.