

اثر فیتواستروژن‌های جنیستئین و بتاسیتوسترول بر برخی شاخص‌های موثر در تولیدمثل ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*)

داود محمدرضائی^۱، باقر مجازی امیری^{۲*}، محمد علی نعمت الهی^۳، چنگیز مخدومی^۴، سید صمد هاشمی^۴

۱. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. کارشناس مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی (سمسکنده)، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۱۹

چکیده

فیتواستروژن‌ها ترکیباتی طبیعی با ظرفیت تغییر عملکرد یا ساختار سیستم غدد درون‌ریز و تولیدمثل در آبزیان هستند که در بیشتر محیط‌های آبی یافت می‌گردند. در این تحقیق، اثر دو فیتواستروژن بر برخی شاخص‌های تولید مثلی (هورمونی: تستوسترون و ۱۷-بتا-استرادیول، یونی: کلسیم و آنزیمی: آروماتاز و EROD) ماهی سفید دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۴۹ عدد مولد ماده ماهی سفید به مدت ۲۱ روز در معرض ۳ سطح جنیستئین و ۳ سطح بتاسیتوسترول با غلظت‌های ۵۰، ۵۰۰ و ۱۰ نانوگرم بر لیتر قرار گرفتند. از خون و بافت ماهیان در پایان آزمایش نمونه‌برداری انجام شد و سنجش فاکتورهای بیان شده بر حسب پروتکل‌های موجود اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که سطح بالای جنیستئین منجر به افزایش سطح هورمون استروژنی ۱۷-بتا-استرادیول و فعالیت آروماتاز می‌گردد. سطح بالای بتاسیتوسترول نیز سبب افزایش میزان تستوسترون و فعالیت EROD شد. هر دو فیتواستروژن بر میزان کلسیم تأثیر معنی‌داری نشان ندادند. طبق یافته‌های این تحقیق، جنیستئین در غلظت‌های بالا (۵۰۰ نانوگرم بر لیتر) می‌تواند به‌عنوان محرک سیستم غدد درون‌ریز عمل نموده و سبب تغییر در سطح هورمون‌های استروئیدی بویژه ۱۷-بتا-استرادیول و فعالیت آروماتاز می‌گردد. همچنین مشخص گردید که بتاسیتوسترول در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر با القاء EROD و افزایش تستوسترون و برهم زدن عملکرد کلسترول در مسیر بیوسنتز هورمون‌های جنسی می‌تواند به‌عنوان یک عامل برهم زننده سیستم غدد درون‌ریز به شمار آید. وجود این ترکیبات با غلظت‌های ذکر شده در رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌تواند در دراز مدت بر عملکرد تولیدمثلی ماهی سفید تأثیر منفی داشته باشد.

واژگان کلیدی: جنیستئین، بتاسیتوسترول، ماهی سفید، هورمون‌های استروئیدی، کلسیم، آروماتاز، EROD.

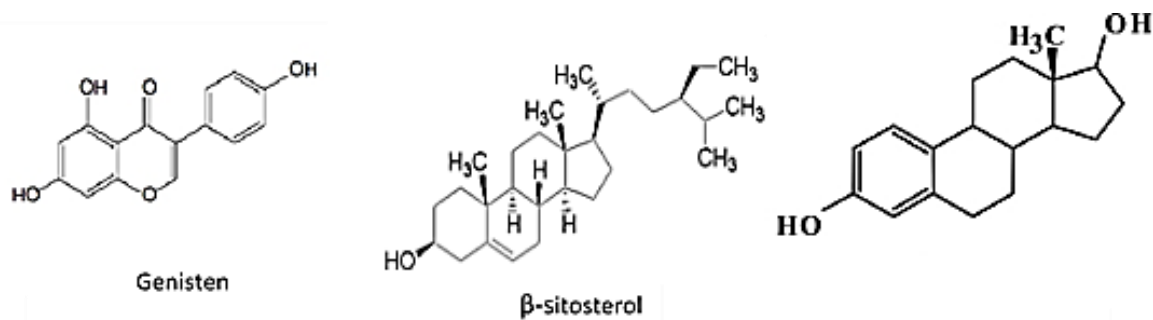
۱. مقدمه

(2010b). به دلیل شباهت ساختاری (شکل ۱) استرول‌های گیاهی با استروئیدها، آن‌ها می‌توانند به گیرنده‌های استروژنی و آندروژنی ER/AR (Estrogen receptor/Androgen receptor) متصل شوند (Orrego *et al.*, 2010b). همچنین فیتواستروژن‌ها می‌توانند بر تولید هورمون‌های استروئیدی جنسی نظیر تستوسترون، 11KT و 17 β -استرادیول و سطح آن‌ها در پلازما تاثیر گذار باشند (Stevenson *et al.*, 2011). سیتوکروم‌های P450 خانواده بزرگی از پروتئین‌های خونی بوده که برای متابولیسم استروژن ضروری هستند. در میان آنها CYP1A و اتوکسی‌رزرفین-آ-دتیلاز (lase EROD=Ethoxyresorufin-O-dee thy) به‌عنوان مهم‌ترین شاخصه‌های زیستی برای در معرض قرار گیری آبزیان در برابر انواع آلاینده‌های آلی و ترکیبات شبه استروژنی در نظر گرفته می‌شود. یافته‌های آزمایشگاهی تاثیر جنیستین بر مهار فعالیت EROD را بیان کرده‌اند (Green and Kelly, 2009).

تاثیر پساب کارخانه کاغذ سازی و مواد شیمیایی برهم زنده غدد درون ریز بر تولیدمثل ماهیان در ماهی سر درشت (*Zoarces viviparous*)، ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*)، کپور کفزی (*Gobio gobio*)، فلاندر (*Platichthys flesus*)، باربوس (*Barbus plebejus*)، سوف سفید (*Sander lucioperca*) و ماهی خاویاری (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) در نزدیکی محل تخلیه پساب گزارش شده است (Kiparsis *et al.*, 2003).

در بسیاری از کشورها غلظت فیتواستروژن‌ها در محیط‌های آبی مختلف در دامنه‌ای از ۳ نانوگرم بر لیتر تا ۱۴۳ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است، در حالی- که غلظت‌های ۱ نانوگرم بر لیتر می‌تواند اثرات نامطلوبی بر عملکرد اندوکراینی ماهیان داشته باشد (Kuster *et al.*, 2009; Kiparsis *et al.*, 2003). به دلیل دخالت این ترکیبات در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی و زرده‌سازی، سنجش این هورمون‌ها و زرده و به طبع آن کلسیم می‌تواند به‌عنوان شاخصی از میزان تاثیر گذاری فیتواستروژن‌ها بر آبزیان بیان گردد. با توجه به صنعتی شدن کشور و ورود انواع فاضلاب‌ها و رواناب‌های صنعتی (از جمله کارخانه

استروژن‌های بیرونی (Xenoestrogen)، زیر مجموعه‌ای از مواد شیمیایی هستند که یک گروه از ترکیبات زیست محیطی مهم شناخته شده و یکی از ترکیبات برهم زنده غدد درون ریز (= EDC Endocrine disrupting chemicals) را تشکیل می‌دهند. آلاینده‌های استروژنی عملکرد غدد درون ریز از جمله ساخت، انتقال، در دسترس بودن و یا سنتز هورمون‌های درون ریز را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مواد موجود در تولیدات کشاورزی، ضایعات صنعتی و فاضلاب تصفیه نشده که به رودخانه‌ها، نهرها، دریاچه‌ها و آب‌های دیگر از طریق تجمع رسوب تخلیه می‌شوند، انتقال کود و همچنین گل و لای جاده‌ها، حاوی برخی از این مواد بوده که توانایی تاثیر بر سیستم‌های غدد درون ریز و فعالیت‌های هورمونی همه حیوانات از جمله انسان و ماهی را دارند (Cederroth *et al.*, 2012). از میان این استروژن‌ها، حجم عظیمی از مواد مشتق شده گیاهی به نام فیتواستروژن‌ها به‌طور طبیعی در محیط وجود دارند. فیتواستروژن‌ها ترکیباتی هستند که دارای ظرفیت تغییر عملکرد یا ساختار سیستم غدد درون ریز بوده و باعث عوارضی نظیر تغییر زمان بلوغ، ظرفیت تولید فرزندان نابارور و رفتار خاص جنسی می‌شوند (Turker and Takemura, 2011). همچنین برخی مطالعات بیان کرده‌اند که بیش‌تر فیتواستروژن‌ها به‌عنوان برهم زنده‌های هورمونی عمل نموده و سبب ایجاد دو جنسیتی در ارگان‌های آبی می‌گردند (Ze-hua Liu *et al.*, 2010). در میان فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها جنیستین یکی از ترکیبات فیتواستروژنی است که اثر شبه استروژنی داشته و قادر به مهار آنزیم آروماتاز و القاء سنتز هورمون جنسی متصل به گلوبولین (SHBG=Sex hormone-binding globulin) می‌باشد (Cederroth *et al.*, 2012). بتاسیتوسترول (β -Sitosterol) اصلی‌ترین استرول گیاهی محصول عمده کارخانه خمیر و کاغذسازی) از دیگر ترکیبات گیاهی است که می‌تواند در فرآیند تولید مثل اختلال ایجاد کند. حضور این ترکیب در آب سبب مهار استروئید سازی و تغییر سطوح هورمون‌های جنسی، القاء تولید و یا افزایش سطح زرده در ماهیان می‌شود (Orrego *et al.*,)



شکل ۱ - ساختار شیمیایی جنیستین، بتاسیتسترول و استرادیول.

هر تیمار به آن افزوده شد. پس از ۲۱ روز در معرض قرار گیری (Stevenson *et al.*, 2011)، از هر تیمار ۳ مولد به‌طور تصادفی به منظور بررسی سطح اثر ترکیبات و غلظت‌های تعیین شده در تحقیق انتخاب شد. مولدین با گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (Sharif pour *et al.*, 1381) بیهوش و به منظور سنجش هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و تستوسترون و کلسیم در سرم خون، خون گیری شدند. پس از خون‌گیری، از تخمدان و کبد ماهیان برای سنجش فعالیت آروماتازی و EROD نمونه برداری گردید. نمونه‌ها در ازت مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- سانتیگراد تا زمان سنجش نگهداری شدند. سرم خون نیز با سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جدا سازی شد و در دمای ۲۰- تا زمان سنجش پارامترهای مورد نظر نگهداری شد.

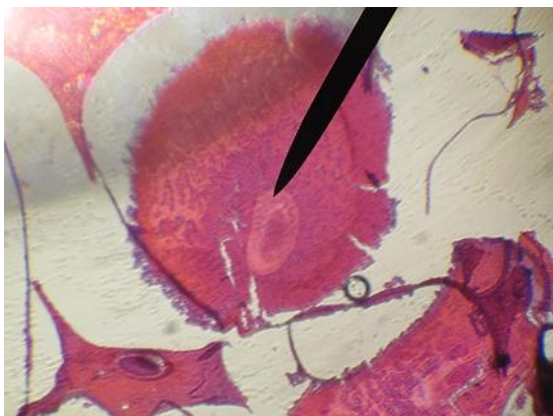
هورمون‌های ۱۷-بتا-استرادیول و تستوسترون با روش الیزا و توسط کیت‌های هورمونی (کمپانی ویداس (vidas)، کشور فرانسه) و کلسیم به روش کلریمتریک توسط دستگاه اتوآنالایزر سنجیده شد.

به‌منظور سنجش فعالیت آروماتاز ۱ گرم از بافت تخمدان به همراه ۷ سی‌سی بافر PBS (pH=۷/۴) توسط هموژنایزر شیشه‌ای دستی هموژنیزه و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۴۰ میکرولیتر از محلول فوقانی برداشته و طبق دستورالعمل الحاقی کیت مورد استفاده توسط دستگاه الیزا سنجیده شد و در پایان میزان فعالیت آروماتازی بر حسب پروتئین کل بدست آمد. جهت سنجش القاء EROD، یک گرم از بافت کبد در ۵ میلی لیتر بافر کلرید پتاسیم در هموژنایزر شیشه‌ای دستی هموژنیزه شد. سوسپانسیون حاصله با محلول بافر ۱/۱۵٪ کلرید پتاسیم (KCl) حاوی ۱ میلی مولار EDTA شسته شد و مجدداً در گلیسرول ۱۰ درصد حاوی ۱ میلی

کاغذسازی مازندران)، کشاورزی و انسانی به رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر به‌ویژه رودخانه تجن، وجود و افزایش انواع فیتواستروژن‌ها را در این رودخانه محتمل می‌سازد. ماهی سفید (*Rutilus Kutum*) از گونه‌های رودکچ و اقتصادی دریای خزر بوده، که طی ماه‌های اسفند و فروردین جهت تکمیل فرایند تولیدمثلی وارد رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌شوند (Jafari *et al.*, 2009). در طی این مدت مولدین با ترکیبات و آلاینده‌های مختلفی از جمله فیتواستروژن‌ها مواجه خواهند شد، که هر کدام از این مواد می‌تواند بر عملکرد تولیدمثلی ماهیان در معرض و در دراز مدت بر ساختار جمعیتی آن‌ها اثر منفی داشته باشد. از این‌رو تحقیق حاضر چگونگی اثر برخی از این فیتواستروژن‌ها را بر شاخص‌های تولید مثلی ماهی سفید مهاجر به رودخانه را بررسی نموده است.

۲. مواد و روش‌ها

تعداد ۴۹ عدد مولد ماده نارس ماهی سفید (*Rutilus Kutum*) با میانگین وزن 15 ± 680 گرم، از رودخانه شیروود شهرستان تنکابن ($36^{\circ}51'N-50^{\circ}47'E$) توسط تور پرتابی در اوائل بهار صید و از نظر بافت شناسی بررسی شدند. مولدین پس از ۴۸ ساعت سازگاری در آب شیرین کنار رودخانه، به ازاء هر تانک ۷ مولد به تانک‌های ۳۰۰ لیتری آب شیرین منتقل گردیدند. مولدین در هر تانک به‌طور مجزا در معرض ۳ سطح جنیستین و ۳ سطح بتاسیتسترول با غلظت‌های (۵۰، ۵۰۰، ۵۰) و ۱۰ نانوگرم بر لیتر (شرکت سیگما آلد ریج- آلمان) قرار گرفتند. به‌منظور اطمینان از وجود غلظت‌های واقعی ترکیبات فیتواستروژنی در تانک در طول دوره آزمایش، آب تانک‌ها هر ۴۸ یکبار ۱۰۰٪ تعویض و غلظت جنیستین و بتاسیتسترول



شکل ۱- و وضعیت تخمدان مولدین ماهی سفید دریای خزر قبل از شروع آزمایش (بزرگ نمایی X40).

(نمودار ۲). هرچند که با افزایش میزان غلظت بتاستوسترون میزان تستسترون نیز افزایش یافت. کمترین میزان غلظت هورمون تستسترون در مولدین در معرض جنیستئین ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر مشاهده شد. برخلاف بتاستوسترون، غلظت‌های مختلف جنیستئین بر روی مولدین اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). در مولدین در معرض جنیستئین با افزایش غلظت، میزان هورمون کاهش یافت و به سطح آن در ابتدای دوره آزمایشی نزدیک شد.

در این بررسی میزان غلظت کلسیم به‌عنوان معیاری از ویتلوژنیز سنجدیده شد. نمودار ۳ تغییرات غلظت کلسیم را تحت تاثیر تیمارهای مختلف جنیستئین و بتاستوسترون نشان می‌دهد. در کلیه تیمارها، اختلاف معنی‌داری در سطح کلسیم خون مشاهده نگردید ($P < 0/05$). هرچند غلظت‌های بالا در هر دو ترکیب در تیمارهای با ۵۰ نانوگرم بر لیتر مشاهده شد. از طرف دیگر الگوی تغییرات کلسیم در هر دو ترکیب یکسان بوده و مقادیر بالاتری نسبت به شاهد را نشان دادند. هرچند میزان کلسیم در کلیه تیمارها در پایان دوره با میزان آن در روز نخست اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

فعالیت آروماتاز تخمدان در مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتاستوسترون اختلاف معنی‌داری را در سطح تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). بالاترین میزان فعالیت آروماتازی در مولدین در معرض جنیستئین ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر و کمترین آن در مولدین در معرض ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر به‌دست آمد (نمودار ۴). در مقایسه با شاهد و روز

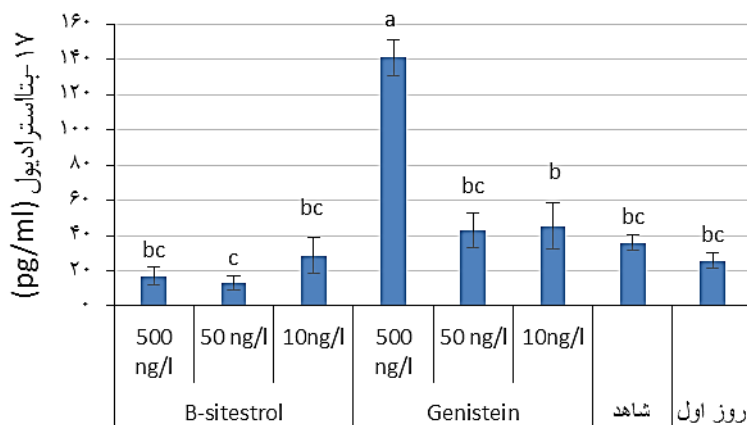
مولار EDTA حل و در سه مرحله با سانتریفیوژ افتراقی به ترتیب به ترتیب $500 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه، $10000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه و $100000 \times g$ به مدت ۶۰ دقیقه از سانتریفیوژ و میکروزم کبدی جهت سنجش القاء EROD به‌دست آمد. محلول میکروزمی توسط کیت EROD مخصوص ماهی کمپانی (Bioassay Technology Laboratory، کشور چین) سنجدیده و بر حسب پروتئین کل بیان گردید (Karimzadeh *et al.*, 2012). چون برای تعیین میزان فعالیت آروماتاز و EROD نیاز به پروتئین کل خون می‌باشد، مقدار آن در همه گروه‌ها سنجدیده شد. برای تعیین پروتئین کل از روش بیورت (Biuret) در هر نمونه استفاده شد (Annino and Giese, 1976). این تحقیق در قابل طرح کاملاً تصادفی ساده انجام و کلیه داده‌ها، با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین (آزمون چند دامنه‌ای دانکن) در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS (ورژن ۱) تجزیه و تحلیل شدند.

۳. نتایج

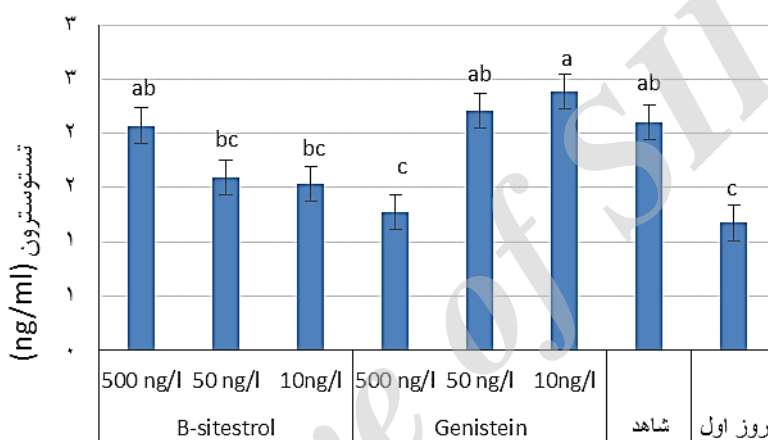
نتایج بررسی بافت‌شناسی نشان داد که مولدین صید شده در مرحله ۴ رسیدگی جنسی قرار داشتند (شکل ۲). مطالعات دیگر نیز وضعیت مولدین صید شده در مصب رودخانه‌های جنوبی دریای خزر را نیز مرحله ۴ و ۵ گزارش کرده‌اند (Aminian Fatide *et al.*, 2006).

پس از ۲۱ روز قرار گیری مولدین در معرض جنیستئین و بتاستوسترون، نتایج نشان داد که این ترکیبات در غلظت بالا می‌توانند بر عملکرد هورمون‌های موثر در تولید مثل ماهیان تاثیر گذار باشند. همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد، مقادیر بالای جنیستئین سبب افزایش سطح ۱۷بتا-استرادیول در سرم خون شده به شکلی که این تیمار با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$). در مولدین تیمار شده نیز غلظت‌های تعیین شده اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

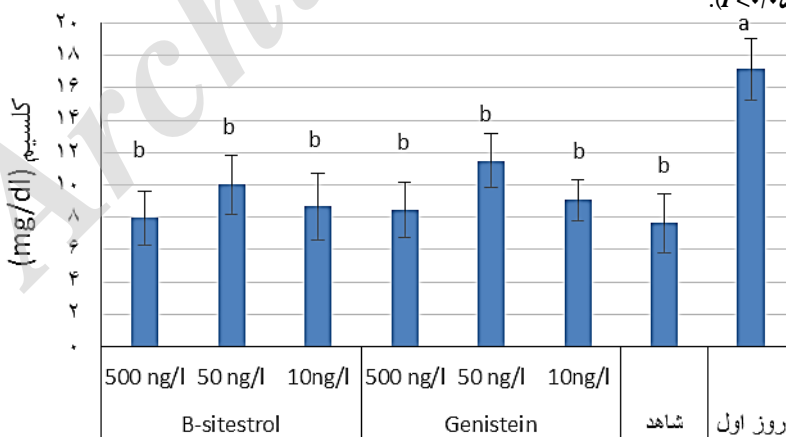
در تیمارهای حاوی بتاستوسترون اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نگردید ($P < 0/05$)



نمودار ۱ - تغییرات میزان 17β-استرادیول در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستین و بتا سیتوسترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها ($a < b < c$) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است ($P < 0.05$).



نمودار ۲ - تغییرات میزان هورمون تستوسترون در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستین و بتا سیتوسترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها ($a < b < c$) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است ($P < 0.05$).

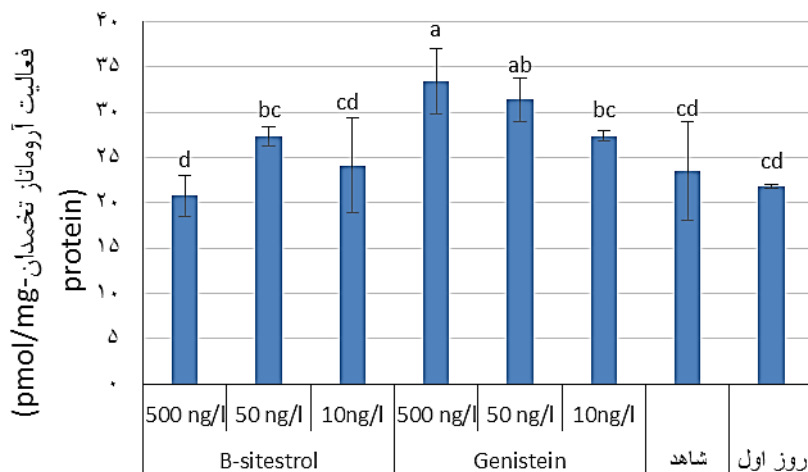


نمودار ۳ - تغییرات میزان کلسیم در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستین و بتا سیتوسترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها ($a < b < c$) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است ($P < 0.05$).

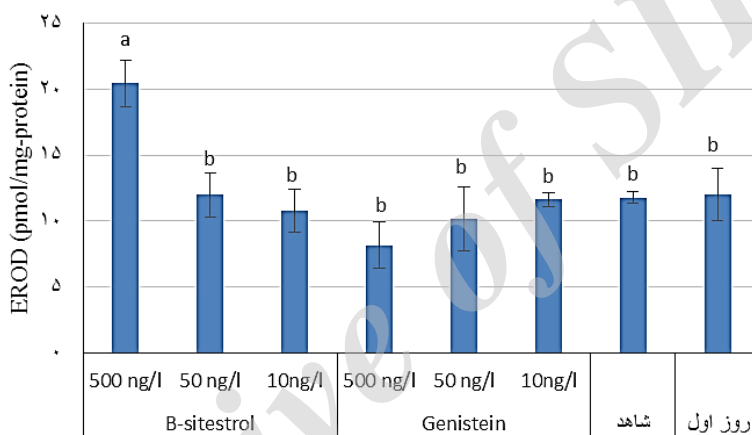
فعالیت آروماتازی سنجش شده در روز نخست بیشتر بود.

تغییرات فعالیت EROD در مولدین در معرض

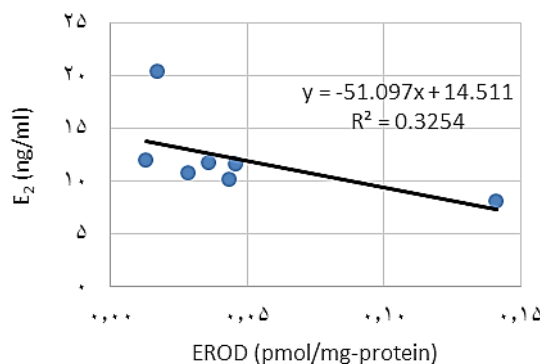
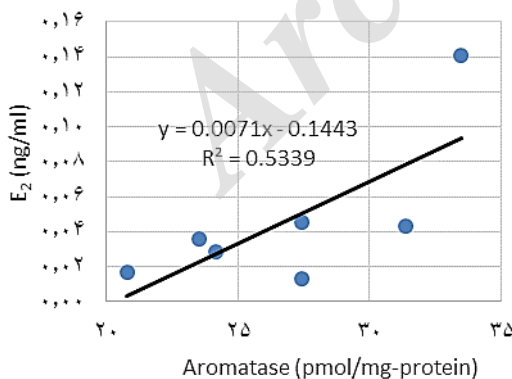
نخست آزمایش، به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد جنیستین سبب افزایش فعالیت آروماتازی گردیده است. این افزایش در مولدین در معرض جنیستین در مقایسه با



نمودار ۴ - تغییرات میزان فعالیت آروماتاز تخمدان در سطح سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها ($a < b < c$) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است ($P < 0.05$).



نمودار ۵ - تغییرات میزان فعالیت EROD کبد در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها ($a < b < c$) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است ($P < 0.05$).



نمودار ۶ - رابطه همبستگی بین فعالیت آروماتازی تخمدان و EROD کبد با سطح استرادیول سنجیده شده در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول.

غلظت بتاسیتوسترول میزان فعالیت EROD افزایش یافته در حالی که در مولدین در معرض جنیستئین با افزایش غلظت، از فعالیت EROD کاسته شد. هرچند

جنیستئین و بتاسیتوسترول روند مشابهی نشان نداد. میزان فعالیت پارامتر مذکور اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). به‌شکلی که با افزایش

۵۰۰ نانوگرم بر لیتر جنیستین، احتمالاً در تمایل بیشتر این ترکیب در اتصال به گیرنده‌های استروژنی (ERs) و تغییر متابولیسم هورمون استروئیدی باشد. مکانیسم عمل دقیق فیتواستروژن بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی ماهی ناشناخته و نیازمند تحقیقات بیشتری برای تعیین مکانیسم اثر گذاری بر ماهیان است (Shanhan and Shaoguo, 2009). Orrego و همکاران (۲۰۱۰) افزایش سطح استرادیول ۴ روز پس از تزریق پساب به بچه ماهی قزل‌آلای تریپلوئیدی را بیان کردند، هرچند Stevenson و همکاران (۲۰۱۱) تفاوتی را در غلظت استرادیول در ماهی نر جنگجو (*Betta splendens*) در معرض ۱ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر جنیستین و بتاسیتسترول در طی ۲۱ روز گزارش نکردند.

نتایج آنالیز واریانس غلظت هورمون تستوسترون در سرم خون نیز بیانگر تاثیر ترکیبات فیتواستروژنی بر این هورمون است. تستوسترون از دیگر هورمون‌های جنسی است که سنتز آن توسط مکانیسم‌های سلولی مختلف کنترل می‌شود. القاء فعالیت آروماتازی می‌تواند سبب برهم زدن تعادل این هورمون گردد (Green and Kelly, 2009; Augustine, 2001). غلظت تستوسترون در ماهیان در معرض بتاسیتسترول در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Orrego et al., 2010a; Maclatchy et al., 2006; Sharpe et al., 1995). همچنین مشخص شده که بتاسیتسترول با کاهش غلظت کلسترول پلاسما، منجر به کاهش هورمون‌های استروئیدی جنسی پلاسما شده و در نتیجه عملکرد تولیدمثل ماهی را تغییر می‌دهد (Nakari et al., 2003). یافته‌های این تحقیق همانند سایر مطالعات نشان داد که تولید هورمون‌های استروئیدی جنسی تستوسترون و استرادیول و سطح آنها در پلاسما می‌تواند تحت تاثیر فیتواستروژن‌ها قرار گیرند (Stevenson et al., 2011). در گلدفیش تغذیه شده با جنیستین سطح تستوسترون در نر و ماده تا حد کمی کاهش و سطح استرادیول افزایش یافت (Bagheri et al., 2013). همانطور که عنوان گردید میزان کلسیم خون را می‌توان شاخصی از میزان ویتلین در نظر گرفت، چرا که با تغییر میزان ویتلین، سطح یون کلسیم در خون نیز به همان ترتیب تغییر می‌یابد (Hosseinzadeh

که بین تیمارهای مختلف جنیستین اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. بر اساس (نمودار ۵) بالاترین میزان فعالیت EROD در مولدین در معرض ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر و کمترین آن در تیمار ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر جنیستین مشاهده شد.

رابطه بین غلظت استرادیول با میزان فعالیت آروماتازی تخمدان و EROD در کبد در نمودار ۶ آورده شده است. این همبستگی با میزان فعالیت آروماتازی تخمدان مثبت بود، به طوری که با افزایش فعالیت آروماتازی، سطح استرادیول در سرم خون ماهیان مولد در معرض نیز افزایش یافت. از طرف دیگر این همبستگی در خصوص فعالیت EROD منفی است.

۴. بحث و نتیجه گیری

فیتواستروژن‌ها ترکیبات گیاهی هستند که به لحاظ ساختاری و یا عملکردی پاسخ‌های بیولوژیکی مشابه به فعالیت استروژن‌های درونی (مانند ۱۷بتا استرادیول) و متابولیت‌های فعال آن‌ها، معمولاً از طریق اتصال به گیرنده استروژنی درون سلولی، القاء می‌کنند (Whitten and Patisaul, 2001). جنیستین یکی از ترکیبات فیتواستروژنی است که با تقلید اثر القایی هورمون استرادیول سبب افزایش غلظت این هورمون در سرم خون مولدین ماهی سفید دریای خزر گردید. به شکلی که با افزایش میزان غلظت جنیستین در محیط نگهداری تا ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر، غلظت هورمون استرادیول حدوداً سه برابر افزایش یافت. این افزایش مطابق با افزایش فعالیت آروماتازی در همین تیمار، بیانگر القاء مسیر سنتزی استرادیول توسط آنزیم استروئید سزاسیتوکروم P450 آروماتاز است (Afonso et al., 2001). تولید E2 تخمدانی در طی زرده سازی مطابق با بیان و فعالیت CYP19 افزایش می‌یابد. این امر در گلدفیش، قزل‌آلا، مداکا، تیلپیا و بریم گزارش شده است (Brueggemeier et al., 2005). از این رو افزایش فعالیت آروماتازی و غلظت بالای استرادیول و مقادیر کم تستوسترون در مولدین در معرض جنیستین می‌تواند احتمالاً به دلیل افزایش بیان آروماتاز و شروع فعالیت آن باشد (Brueggemeier et al., 2005). افزایش هورمون استرادیول در تیمار

می‌آید (Nakari *et al.*, 2003). در تحقیق حاضر، وجود این ترکیب در محیط آبی باعث القاء EROD در مولدین در معرض شد. در طی رسیدگی جنسی و تولید مثل، فعالیت (EROD) و (AHH=Aryl hydrocarbon hydroxylase) با افزایش سطح استرادیول در ماهیان ماده کاهش می‌یابد، به عبارتی با آن رابطه معکوس دارد (Green and Kelly, 2009). نتیجه مشابهی نیز در این تحقیق مشاهده شد.

طبق یافته‌های این تحقیق، جنیستین در غلظت‌های کم (۵۰۰ نانوگرم بر لیتر) می‌تواند به‌عنوان محرک سیستم غدد درون‌ریز عمل نماید و سبب تغییر در سطح هورمون‌های استروئیدی به‌ویژه استرادیول و فعالیت آروماتازی گردد. همچنین بتاسیتوسترول در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر با القاء EROD و افزایش تستوسترون، یک عامل برهم زننده سیستم غدد درون‌ریز به‌شمار می‌آید. تاثیرگذاری فیتواستروژن‌ها بر عملکرد تولیدمثل ماهی از طریق مکانیسم‌های مختلف عنوان شده است. عملکرد این ترکیبات در ماهیان به نسبت فیتواستروژن‌ها به استروژن‌های درونی، فعالیت آروماتازی، گونه و وضعیت تولیدمثلی، مدت زمان در معرض قرارگیری و روش اضافه نمودن، بستگی دارد (Andersen *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2000). تفاوت‌های عنوان شده در نوع و شدت تاثیرگذاری انواع فیتواستروژن‌ها بر ماهیان، همان‌طور که بیان شده است، احتمالاً می‌تواند خاص گونه‌ای بوده و عملکردی ضد استروژنی یا همراه (آنتی‌آگونیست) با استروژن‌های داخلی داشته باشد (El-Sayed *et al.*, 2012). در پایان به‌نظر می‌رسد، وجود این ترکیبات با غلظت‌های ذکر شده در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند در دراز مدت بر عملکرد تولیدمثلی ماهی سفید دریای خزر تاثیر منفی داشته باشد. از این‌رو برای اطمینان از این موضوع تحقیقات بیشتری ضروری به‌نظر می‌رسد.

References

- Aminian Fatide, B., Hossein Zadeh Sahafi, H., Shabani, A., Yaghmaie, F. 2006. Reproduction characteristics of *Rutilus frisii kutum* in the southern coast of Caspian Sea. *Pajouhesh & Sazandegi* 79, 144-152.
- Sharif pour, A., Soltani, M., Abdolhay, H., Ghayumi, R., 1381. Anesthetic effect of clove extract (*Eugenia caryophyllata*) at different pH and temperature conditions on common carp juvenile. *Iranian fisheries*

(*et al.*, 2013). بالا بودن میزان کلسیم در همه تیمارها نسبت به شاهد، علی‌رغم معنی‌دار نبودن، می‌تواند بیانگر شکل‌گیری ویتلین باشد. چرا که نقش هر دو ترکیب در القاء ویتلوژنیز در بسیاری از مطالعات و گونه‌های که در معرض جنیستین و بتاسیتوسترول و یا ترکیبات فیتواستروژنی قرار گرفته‌اند بیان شده است (Nakari *et al.*, 2003; Palace *et al.*, 2006; Orrego *et al.*, 2010). آروماتاز از مهمترین آنزیم‌ها در مسیر بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی جنسی است. این آنزیم در زمان آغاز فرایند چرخه تولیدمثلی و مراحل زرده سازی به‌تدریج فعالیتش افزایش یافته و بعد از پایان این چرخه به سطح پایه خود بر می‌گردد (Brueggemeier *et al.*, 2005). فیتواستروژن همچنین با تنظیم فعالیت آروماتازی و ۵ آلفاردوکتاز در شرایط آزمایشگاهی بیوسنتز استروئیدها را تحت تاثیر قرار داده و سطح هورمون جنسی پلازما متصل به گلوبولین (SHBG) را تنظیم می‌کنند (Adlercreutz *et al.*, 1992). این امر دسترسی استروئید زیست فعال آزاد و تعادل آندروژن به استروژن را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Dechaud *et al.*, 1999). این یافته‌ها ظرفیت بالقوه جنیستین را در کنار سایر فیتواستروژن‌ها در بیوسنتز استروئیدی و تاثیر این ترکیبات بر توسعه و عملکرد سیستم تولیدمثلی و غدد درون‌ریز را نشان می‌دهد (Cederroth *et al.*, 2012).

اثرات فیتواستروژن‌ها بر کبد شامل القاء ویتلوژنیز در ماهی ماده و تغییر در فعالیت EROD می‌باشد. فعالیت EROD به‌عنوان یک بیوماکر خوب در خصوص آلاینده‌ها، بویژه آلاینده‌های آلی مطرح شده است (Whyte *et al.*, 2000). بتاسیتوسترول از ترکیبات آلی رایج در ترکیبات پساب خروجی کارخانه چوب کاغذ بوده، که به‌عنوان یک ماده آلاینده به‌شمار

Journal 15, 4:59-73.

- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Hockerstedt, K., Hamalainen, E., Wahala, K., Makela, T., Hase, T., 1992. Dietary Phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41, 331-337.
- Afonso, L.O.B., Wassermann, G.J., De Oliveira, R.T., 2001. Sex Reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a non-steroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology* 290, 177-181.

- Andersen, L., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., 2003. Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 319-321.
- Annino, J.S., Giese, R.W., 1976. Clinical Chemistry principles and procedures. 4th edition. Little, Brown and Company, Boston, USA.
- Augustine, A., 2001. Cellular and Molecular Responses to Endocrine- Modulators and the Impact on Fish Reproduction. *Marine Pollution Bulletin* V 42(8), 643-655.
- Bagheri, T., Imanpoor, M. R., Jafari, V., Bennetau-Pelissero, C., 2013. Reproductive impairment and endocrine disruption in goldfish by feeding diets containing soybean meal. *Animal Reproduction Science* 139, 1-4, 136-144.
- Brueggemeier, R.W., Hackett, J.C., Diaz-Cruz, E.S., 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews* 26, 331-345.
- Cederroth, C.R., Zimmermann, C., Nef, S., 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health, "Review". *Molecular and Cellular Endocrinology* 355, 192-200.
- Dechaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perriere, A.B., Pugeat, M., 1999. Xenooestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids*, 64, 328-334.
- Green C.C., Kelly, A.M., 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.
- Hosseinzadeh, M., Imanpoor, M.R., Shabani, A., Nekoubin H., 2013. Seasonal changes in serum calcium and 17 β -Estradiol levels in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Journal of Aqua Res Development* 4, 159.
- Jafari, M., Kamarudin, M.S., Saad, C.H.R, Arshad, A., Oryan, S.H., Bahmani, M., 2009. Development of morphology in hatchery-reared *Rutilus frissi kutum* Larvae. *European Journal of Science Research* 38(2), 296-305.
- Karimzadeh, K., Mostafae, A., Zahmatkesh, A., 2012. Detection of Cytochrome P450 1A Content Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Two Species of Sturgeon. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4(6), 604-608.
- Kiparissis, Y., Balch, G.C., Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., 2003. Effects of the Isoflavones Genistein and Equol on the Gonadal Development of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspect* 111.
- Kuster, M., Azevedo, D.A., López de Alda, M.J., Aquino Neto, F.R., Barceló, D., 2009. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International* 3, 997-1003.
- M. El-Sayed, A.F., Abdel-Aziz, E.S.H., Abdel-Ghani, H.M., 2012. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17 α -Methyl testosterone. *Aquaculture* 360-361, 58-63.
- Maclatchy, L.D.J., Van der kraak, G., 1995. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134, 305-312.
- Nakari, T., Erkomaa, K., 2003. Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multi-generation test. *Environmental Pollution* 123, 267-273.
- Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R., Holdway, D., 2010a. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 99, 160-167.
- Orrego, R., McMasterb, M., Van Der Kraakc, G., Holdway, D., 2010b. Effects of pulp and paper mill effluent extractives on aromatase CYP19a gene expression and sex steroid levels in juvenile triploid rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 97, 353-360.
- Palace, P.V., Wautier, G., Eavans, R.E., Blanchfield, J.P., Mills, H.K., Chalanchuk, M.S., Godard, D., McMaster, E.M., Tetreault, R.G. Peters, E.L., Vandenbyllaardt, L., Kidd, K., 2006. Biochemical and histopathological effects in pearl dace (*Margariscus Margarita*) chronically exposed to synthetic estrogen in a whole lake experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4), 1114-1125.
- Shanhan, M., Wei, W., Shaoguo, R.U., 2009. Reviews of study progress on the effects of phytoestrogen on fish. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2, 014.
- Sharpe, L.R., Drolet, M., MacLachy, L.D., 2006. Investigation of de novo cholesterol synthetic capacity in the gonads of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to the phytosterol beta-sitosterol. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 60.
- Stevenson, M.L., C. Brown, A.M., Montgomery, T.D., Clotfelter, E., 2011. Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 501-510.
- Tsai, C.-L. Wang, L.-H., Chang, C.F. Kao, C.-C., 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Neuroendocrinology* 49, 894-898.