Archive of SID

سطوح باقیمانده هورمون‌ها در تخمک تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی

محمود بهمنی*[۱]، ایوب یوسفی جوردهی[۱]، علی حلاجیان[۱]، محمد پوردهقانی[۱]، یزدان مرادی[۲]، مجید مصدق[۳]

۱- مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر (Areeo)، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور (Areeo)، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹۶۵ - ۱۴۹

۳- سازمان شیلات ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۳۵۳ – ۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: ۲۴ آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۳ اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین باقیمانده سطوح هورمون‌های جنسی ۱۷ بتا - استرادیول (E_2)، ۱۷ آلفا - هیدروکسی پروژسترون (17α-OHP)، تستوسترون (T)، و GTH I و GTH II در عصاره تخمک گونه‌های تاسماهی ایرانی و تاسماهی سیبری در مؤسسه تحقیقات بین-المللی تاسماهیان دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفت. بدین‌منظور، مقدار ۱۰ گرم از خاویار هر گونه بطور مجزا هموژنایزه شده، و عصاره آن پس از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استخراج گردید. نتایج نشان داد که سطوح هورمون GTH I در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۴ میلی‌واحد بین‌الملل در لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۶ میلی‌واحد بین‌الملل در لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). سطوح هورمون GTH II در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۸ میلی‌واحد بین‌الملل در لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۵ میلی واحد بین‌الملل در لیتر در بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). سطوح هورمون تستوسترون در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۹۷ ± ۱۳/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری معادل آن ۰/۰۲ ± ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). بر اساس نتایج حاصل، سطوح پروژسترون در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۱ ± ۲/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری ۰/۱ ± ۱/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). نتایج نشان داد که سطوح استرادیول در گونه تاسماهی ایرانی معادل ۰/۶ ± ۱/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۱ ± ۰/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). بر اساس نتایج حاصل، باقیمانده هورمون‌های جنسی در تخمک تاسماهی ایرانی و تاسماهی سیبری مشاهده گردید که سطوح هورمون‌های استروئیدی بیشتر از هورمون‌های گنادوتروپین I و II بود که بسته به نوع هورمون و گونه تاسماهیان متفاوت می‌باشد.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*)، تخمک، هورمون‌های جنسی .

* عهده‌دار مکاتبات (✉).mahmoudbahmani@ymail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاسماهیان و خاویار استحصال شده از آنها به عنوان یکی از با ارزش‌ترین و مغذی‌ترین محصولات دریایی به شمار می‌رود. خاویار یک ماده غذایی پرانرژی است که طعم و بویی بسیار خوشایند دارد. به‌طور عمده پروتئین موجود در خاویار متشکل از اسیدهای آمینه آرژینین، هیستامین، ایزولوسین، لیزین و متیونین است. خاویار یک ماده غذایی سرشار از انواع ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروتئین، اسیدهای چرب، رنگدانه‌ها و آنتی-اکسیدان‌ها و امگا ۳ است. میزان پروتئین موجود در خاویار تقریباً دو برابر گوشت بدن ماهی است. خاویار سرشار از ویتامین‌های C، B_2، B_6، B_{12}، A، D، E، اسید فولیک، اسید پانتوتنیک، فسفر و عنصر آهن است (بهمنی، ۱۳۸۴).

هورمون‌ها توسط اندام‌های خاصی ساخته می‌شوند و زمانیکه ترشح می‌شوند، در بدن حرکت می‌کنند تا اینکه به اندام هدف برسند. سلول‌های اندام هدف دارای مولکول‌های گیرنده‌ای هستند که گیرنده‌های هورمونی نامیده می‌شوند. هر هورمون یک گروه گیرنده خاص خود را دارد که هورمون بعنوان یک کلید برای قفل عمل می‌کند. گیرنده و هورمون پاسخ‌های مطلوب خاص هر سلول را کنترل می‌کنند (Kumar, 1991).

امروزه جهت تکثیر گونه‌های مختلف تاسماهیان از انواع مختلف هورمونهای محرک سنتتیک از قبیل GnRH، $LHRH-A_2$، اواپریم (مخلوطی از هورمون سنتتیک آزادکننده گنادوتروپین آزادماهیان (sGnRHa) و غیره استفاده می‌کنند که در صورت عدم جوابدهی مناسب مولدین به این هورمونها جهت تکثیر، از آنها جهت تهیه خاویار فشرده استفاده می‌شود. در داخل کشور مطالعات جامعی در خصوص اندازه‌گیری باقیمانده میزان باقیمانده هورمونهای مختلف تزریقی و استروئیدهای جنسی در خاویار تاسماهیان وجود ندارد و بیشتر مطالعات انجام در زمینه اندازه‌گیری سطوح هورمونهای استروئیدی جنسی در پلاسمای خون می-باشد که از جمله آنها می‌توان به مطالعات بهمنی و همکاران (۱۳۸۷الف، ۱۳۸۷ ب، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱) اشاره کرد. در خارج از کشور نیز منابعی در خصوص باقیمانده‌ی هورمونها در خاویار در دسترس نمی‌باشد.

با عنایت به اینکه هر ساله از تعدادی مولدین تاسماهیان پرورشی که به تزریق هورمون‌های سنتتیک جواب نمی‌دهند، خاویار استحصال می‌گردد؛ و با توجه به فقدان اطلاعات در زمینه اندازه‌گیری میزان تجمع انواع هورمونها در خاویار استحصال شده از تاسماهیان پرورشی، و حساسیت مجامع جهانی به موضوع ضرورت ایمنی زیستی (Biosafety) محصول خاویار پرورشی در تجارت جهانی، ضرورت انجام این تحقیق اجتناب‌ناپذیر است. در این راستا، این مطالعه با هدف تعیین میزان باقیمانده هورمونها در یکی از مهمترین و باارزش‌ترین منبع پروتئینی یعنی تخمک گونه بومی (تاسماهی ایرانی) و غیر بومی (تاسماهی سیبری) از تاسماهیان پرورشی در کشور به‌انجام رسید تا بدینوسیله به تدوین استاندارد خاویار و بهبود شاخص سلامت غذایی در جامعه کمک شود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر طی یکسال (۱۳۹۳-۱۳۹۲) به-انجام رسید. پس از مطالعه وضعیت رسیدگی گناد ماهیان از طریق سوک‌زنی و تعیین شاخص GV، مولدینی که در مرحله IV رسیدگی جنسی بوده، و در

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط محیطی مشابهی قرار داشتند، مورد تزریق هورمون LHRH- A_2 به میزان ۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفته و بسته به نوع گونه، مدت زمان جوابدهی به هورمون از ۲۴ ساعت تا ۳۷ ساعت متغیر بود.

پس از اوولاسیون، تخمک‌ها از طریق روش ریزبرش مجرای تخم‌بر استحصال گردید. مقدار ۳۰ گرم از تخمک هریک از گونه‌های تاسماهیان پرورشی ۳ عدد تاسماهی ایرانی و ۳ عدد تاسماهی سیبری در داخل ظروف مخصوص نمونه‌برداری ریخته شد. جهت استخراج مایع بافتی مورد نظر، مقدار ۱۰ گرم از تخمک در درون لوله‌های آزمایش ریخته و هموژنایز گردید. سپس با استفاده از دستگاه میکسر هم زده شده و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه عصاره خاویار به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر استخراج گردید. پس از جداسازی مقدار مشخصی از مایع بافتی با استفاده از میکروسمپلر در درون ویال‌های مخصوص ریخته و تا زمان انتقال به آزمایشگاه در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری سطوح هورمونی و گنادوتروپینی

غلظت هورمونهای تستوسترون، ۱۷ بتا – استرادیول و پروژسترون موجود در عصاره تخمک مولدین ماده تاسماهیان پرورشی به روش ELISA با استفاده از کیت تجاری (Monobined kit، آمریکا) اندازه‌گیری شد. سطوح هورمون‌های گنادوتروپینی به روش ECL و بر اساس خاصیت فسفورسانس اندازه‌گیری گردید. به‌منظور کنترل صحیح از کیفیت آنالیزها، سه نمونه از هر گونه بررسی شد.

آنالیز آماری

بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون (Shapiro–Wilk) انجام و همگنی واریانس با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS 20 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که میزان سطوح هورمون گنادوتروپین I در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۴ میلی واحد بین‌الملل در لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۶ میلی واحد بین‌الملل در لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P< ۰/۰۵$) (شکل ۱).

شکل ۱ – سطوح هورمون گنادوتروپین I در عصاره تخمک گونه‌های مورد مطالعه حرف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

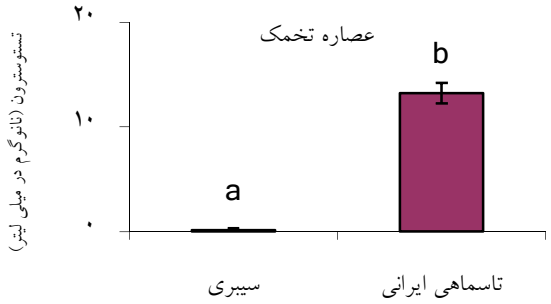
نتایج نشان داد که سطوح هورمون گنادوتروپین II در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۸ میلی واحد بین‌الملل در لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۰۱ ± ۰/۰۵ میلی واحد بین‌الملل در لیتر در بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

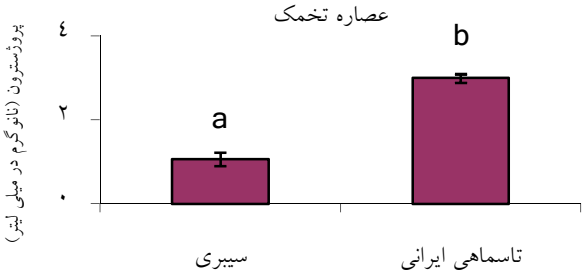
شکل ۲ – سطوح هورمون گنادوتروپین II در عصاره تخمک گونه‌های مورد مطالعه؛ حرف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطوح هورمون تستوسترون نشان داد که میزان آن در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۹۷ ± ۱۳/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری معادل آن ۰/۰۲ ± ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳).



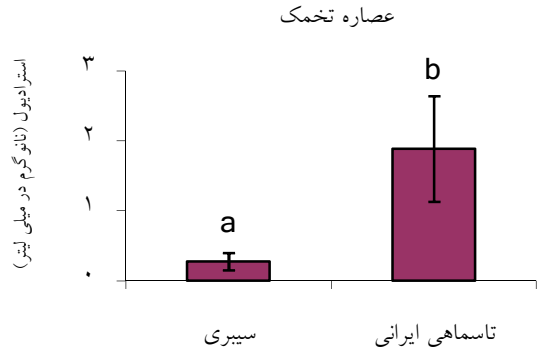
شکل ۳ – سطوح هورمون تستوسترون در عصاره تخمک گونه‌های مورد مطالعه حرف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل، سطوح پروژسترون در تاسماهی ایرانی معادل ۰/۱ ± ۲/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری ۰/۱ ± ۱/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۴).



شکل ۴ – سطوح هورمون پروژسترون در عصاره تخمک گونه‌های مورد مطالعه؛ حرف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل نشان داد که سطوح استرادیول در گونه تاسماهی ایرانی معادل ۰/۶ ± ۱/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر و در تاسماهی سیبری معادل ۰/۱ ± ۰/۳ نانوگرم در میلی-لیتر بود که اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۵).



شکل ۵ – سطوح هورمون استرادیول در عصاره تخمک گونه‌های مورد مطالعه حرف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

با توجه به نتایج حاصل، میزان باقیمانده هورمونهای استروئیدی در خاویار گونه‌های مورد مطالعه به‌طور قابل توجه و در حد نانوگرم بود و سطوح باقیمانده هورمون تستوسترون بیشتر از سایر هورمونها بود که با توجه به بالاتر بودن سطح هورمون تستوسترون نسبت به سایر هورمونها در سرم خون تاسماهیان به‌دلیل

www.SID.ir

Archive of SID

پیش‌ساز بودن تستوسترون برای سایر هورمونهای استروئید جنسی و در نتیجه نیاز بیشتر به آن، این اختلاف بدیهی بنظر می‌رسد. این درحالیست که سطوح هورمونهای گنادوتروپینی به‌طور معنی‌داری کمتر از سطوح هورمونهای استروئیدی بود (P<۰/۰۵).

با توجه به اینکه ممکن است استفاده از هورمونها در تولید حیوانات برای سلامت انسانها مخاطره‌آمیز باشد، محاسبه دقیق هورمونها در حد طبیعی و متابولیسم آن در مایعات بدن و بافت ضروری است و نیز میزان هورمونها در بافت بدن با توجه به وضعیت فیزیولوژیکی حیوان، متفاوت می‌باشد.

Zou و Zhai (۲۰۰۱) با استفاده از روش HPLC در گوشت ماهی کاراس (*Carassius carassius*) بقایای ۱۶ نوع هورمون را که شامل هورمون‌های استرون، استریول، استرادیول، متیل تستوسترون، پریدنیزولون، هیدروکورتیزون، متیل پرید نیزولون، پرید نیزون، بتامتازون، دگزامتازون، تریمزینولون استات، گسترینون، پریدنیزولون استات، هیدروکورتیزون استات، پریدنیزون استات و کورتیزون استات بودند، مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج نشان داد که میزان باقیمانده‌های هورمونی در گوشت کاراس ۱۰ درصد (محدوده ۱۰۰ - ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) می‌باشد و میزان ناخالصی در گوشت ماهی بسیار کم بود. بطوریکه، اثری از هیچ یک از هورمون‌ها مشاهده نشد (Zhai and Zou, 2001).

در مصرف استروئیدهای جنسی در آبزی‌پروری این نگرانی وجود دارد که بقایای هورمونی در ماهیانی که تحت تجویز هورمون قرار داشته‌اند، به مصرف‌کنندگان منتقل می‌شود و یا اینکه این امر باعث آزاد شدن مقادیر هورمون در سطحی غیرقابل قبول به محیط زیست می‌شود (Johnston *et al.*, 1983). لازم بذکر است که هورمون‌ها به‌عنوان میکروآلاینده‌ها بررسی می‌شوند (Verlicchi *et al.*, 2010). بطوریکه اخیراً مشخص شده به دلیل حضور هورمون‌ها در محیط‌های مختلف آبی شرایطی نامتعادل برقرار شده است. زیرا ظرفیت بالایی که در جذب و دفع در خاک و متابولیت‌ها وجود دارد (Lipez - sema *et al.*, 2010)، در آب بسیار کاهش می‌یابد و میزان داروها و متابولیت‌ها در محیط آبی بسیار کم است (Ginebreda *et al.*, 2010). اما در نتیجه ادامه این روند سبب تجمع این مواد در آب می‌شود که می‌تواند اثرات نامطلوب بر موجودات دریایی و خاکی داشته باشد (Daz - Cruz *et al.*, 2003). هورمون‌های باقیمانده در آب دارای خواص فیزیکی و شیمیایی پایدار، چربی دوست و با قابلیت زیست‌فراهمی (Bioavailability) می‌باشند که به آسانی می‌توانند در محیط آبی پخش شوند (Kumar *et al.*, 2009). هورمون‌ها همچنین می‌توانند سبب اختلالات درون‌ریز شوند (Diniz *et al.*, 2010)، زیرا اخلال‌گرهای درون ریز در چربی محلول هستند و در اثر افزایش تمرکز، این ترکیبات در گوشت و تخمک ماهی انباشته می‌شوند (Desbrow *et al.*, 1998).

Thomas و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند با توجه به اینکه میزان هورمون مصرفی توسط هر ماهی کم بوده و نیز سریعاً از بدن دفع می‌شود، مصرف این گونه ماهیها برای انسان مشکلی ایجاد نمی‌کند (Thomas *et al.*, 2003). اما باز هم نگرانی در مورد مصرف ماهیان تیمار شده با هورمونها وجود دارد (Bument and Horki, 2010).

با توجه به اینکه هر ساله در مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر از تعدادی از مولدین تاسماهیان که به

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق هورمون‌های سنتتیک جواب نمی‌دهند، خاویار استحصال می‌گردد؛ و با عنایت به نتایج حاصل در این تحقیق که سطوح باقیمانده هورمونها در تخمک ماهیانی که به منظور تکثیر مورد تزریق هورمون‌های سنتتیک واقع شدند، بیشتر از حد مجاز بنظر می‌رسد، توصیه می‌گردد ترجیحاً از مولدین تزریقی خاویار استحصال نگردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. بهمنی، م. ۱۳۸۴.، خاویار ایران. انتشارات موج سبز و تکنولوژی آموزشی وزارت جهاد کشاورزی. ۱۰۲ صفحه.

۲. بهمنی، م.، کاظمی، ر.، حلاجیان، ع.، محسنی، م.، پوردهقانی، م.، جمیلی، ش.، جمالزاده، ف. یوسفی، ا. و دژندیان، س. ۱۳۸۷ الف.، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی بررسی امکان تکثیر مصنوعی ماهی ازون‌برون (*A. stellatus*) پرورشی (مولدسازی، تکثیر مصنوعی و تولید بچه‌ماهی از مولدین تاسماهی پرورشی). انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۲۸ صفحه.

۳. بهمنی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، کاظمی، ر. پوردهقانی، م.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س. و جلیل‌پور، ج.، ۱۳۸۷ ب. نوسانات فصلی هورمون‌های تستوسترون، ۱۷آلفا – هیدروکسی پروژسترون و ۱۷بتا – استرادیول طی رسیدگی جنسی ماهی ازون‌برون پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴، صفحات ۱۶-۷.

۴. بهمنی، م.، دژندیان، س.، کاظمی، ر.، یوسفی جوردهی، ا.، یزدانی، م.ع.، حلاجیان، ع. ۱۳۹۰. گزارش نهایی طرح خاص مولدسازی و امکان تکثیر مصنوعی فیلماهی پرورشی. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۱۲ صفحه.

۵. بهمنی، م. کاظمی، ر.، یوسفی جوردهی، ا.، یزدانی، م.ع.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س. ۱۳۹۱.، گزارش نهایی پروژه بررسی امکان تکثیر مصنوعی شیپ و تاسماهی ایرانی پرورشی. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۱۴ صفحه.

6. Bument, E.R. and Horki, K. 2010. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Translated by Keivanshouh, S. and Dorafshan, S. Isfahan Industrial University, Pp: 137 - 152.
7. Daz-Cruz, M.S., Alda, M.J.L. and Barcelo, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends in Analytical Chemistry, 22 (6), 340 - 351.
8. Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter. J.P. and Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environmental Science & Technology, 32 (11), 1549 - 1558.
9. Diniz, M.S., Mauricio, R.M., Petrovic., M.J.L., Alda, L., Amaral., I. Peres., Barcelo, D. and Santana, F., 2010. Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. Environmental Science & Technology, 22 (10), 1613 - 1622.
10. Ginebreda, A., Munoz, I., Alda, M.J.L., Brix, R., Lopez-Doval, J. and Barcelo, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). Environment International, 36 (2), 153 - 162.
11. Johnstone, R., Macintosh, D.J. and Wright, R.S., 1983. Elimination of orally administered 17-methyltestosterone by tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri)* juveniles. Aquaculture, 35, 249 - 257.
12. Kumar, K.L., 1991. Studies on the reproductive physiology of *Lates calcarifer* (Bloch), PhD. Thesis, Cochin University of science and technology, India. Pp: 1 - 233.
13. Lipez-Serna, R., Perez, S.A., Ginebreda, Petrovic, M.D. and Barcelo, D., 2010. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography-electrospray–tandem mass spectrometry, Talanta, 83 (2), 410 – 424.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Thomas, P.C., Rath, S.C. and Mohapatra, D.K., 2003. Breeding and seed production of Fin fish and Shellfish, Daya publishing house, Dehli, Pp:1 - 15.
15. Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M. and Barcelo, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. Journal of Hydrology, 389 (3-4), 416 - 428.
16. 16. Zhai, C.H. and Zou, Y., 2001. Determination of hormones in fish (*Carassius Carassius*) by sampling QOPT solid phase extraction with high performance liquid chromatography (HPLC), Rou-Nan Jin Second Military Medical University China, PP: 259 - 412.

www.SID.ir