Archive of SID

تأثیر جنستئین بر کیفیت گامت‌های تولیدی، استروئیدزایی و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

الهام نظافتیان[۱] و وحید زادمجید[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲

چکیده

هدف از این بررسی، تعیین تأثیر فیتواستروژن جنستئین و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (E2) بر فیزیولوژی تولید مثل مولدین ماده‌ی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) در طی مرحله‌ی پیش از تخم‌ریزی بوده است. مولدین ماده‌ی ماهی قرمز در ۵ تیمار با غلظت‌های ۱۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن هورمون ۱۷بتا-استرادیول (E2)، ۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن جنستئین (G5)، ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن جنستئین (G50) و ۱۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن روغن ذرت + دی متیل سولفوکساید (DMSO) (شاهد)، یک روز در میان به مدت ۱۰ روز قبل از تخم‌ریزی به صورت عضلانی تزریق شدند. اختلال در توان تولید مثلی ماهیان از طریق اندازه‌گیری کیفیت گامت‌های تولیدی، شاخص‌های بیوشیمیایی و هورمون‌های استروئیدی سرم خون تعیین گردید. نتایج نشان داد که جنستئین شاخص گنادوسوماتیک را کاهش داد، اما در میزان هم‌آوری و قطر تخمک تأثیرگذار نبود. تزریق جنستئین (G5 و G50) و E2 منجر به کاهش معنی‌دار غلظت تستوسترون سرم خون ماهیان گردید، در حالی که غلظت هورمون ۱۷ بتا-استرادیول سرم خون در تیمارهای E2 و G50 افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار G5 و گروه کنترل نشان داد. سطح شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون (فسفر، کلسترول و تری‌گلیسرید) در تیمارهای G50 و E2 به طور معنی‌داری افزایش یافت. مطالعه‌ی حاضر بر این نکته تاکید دارد که وجود غلظت‌های بالای جنستئین در جیره‌های غذایی ممکن است منجر به اختلال در سیستم درون‌ریز ماهیان و نهایتاً تخریب عملکرد تولید مثلی آنان شود.

کلمات کلیدی: جنستئین، هورمون های استروئیدی، شاخص‌های بیوشیمیایی، کیفیت گامت، ماهی قرمز

مقدمه

امروزه وجود مواد مختل‌کننده‌ی غدد درون‌ریز در محیط زندگی و یا غذای آبزیان مورد توجه محققان قرار گرفته است. از جمله‌ی این مواد مختل‌کننده می‌توان به ترکیبات شبه‌استروژنیک اشاره کرد که به عنوان استروژن-های خارجی زیست‌محیطی می‌توانند عملکرد استروژن-های داخلی بدن به ویژه ۱۷-بتا استرادیول (E2) را تقلید کنند و موجب اختلال در فعالیت تولید مثلی ماهیان شوند (Bjerselius et al. 2001, Kang et al. 2002, Lehtinen et al. 1999) پودر سویا (SBM)[۱] و کنسانتره پروتئین سویا (SPC)[۲]، مواد تشکیل دهنده‌ی غذای آبزیان هستند که به علت هزینه‌ی کم، دسترسی مداوم و تنوع مناسب اسیدهای آمینه در مقایسه با سایر منابع پروتئینی گیاهی به عنوان منبع اصلی پروتئینی جایگزین پودر ماهی در غذای ماهیان مورد ارزیابی قرار گرفته و توانسته‌اند تا حدی جایگزین پودر ماهی در جیره‌های غذایی شوند (Noble et al. 1998, Kaushik et al. 1995, Refstie et al. 2010). با وجود آن که غالباً سویا به عنوان منبع مناسب پروتئینی در تغذیه‌ی ماهیان کاربرد دارد، ولی این منبع پروتئینی

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج

[۲*] استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج E-mail: v.zadmajid@uok.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

1- Soybean meal
2- Soy protein concentrate

www.SID.ir

Archive of SID

غنی از ترکیبات شبه‌استروژنیک غیر استرادیولی به نام فیتواستروژن‌ها[1] می‌باشد که در غلظت بالای باعث تداخل در رشد و بلوغ گناد ماهیان می‌شود (Bennetau-Pelissero et al. 2003, Ferancis et al. 2001).

فیتواستروژن‌ها ترکیبات طبیعی مشتق شده گیاهی و هورمون‌های ضعیفی هستند که ساختار استروئیدی داشته و فعالیت زیستی شبه استروژنی به ویژه شبیه استرادیول را دارا بوده و بدین صورت تعریف می‌شوند که از نظر ساختمان و عمل شبیه ۱۷بتا–استرادیول می‌باشند و یا این که اثراتی شبیه استروژن را ایجاد می‌نمایند (Knight et al. 1995). اصلی‌ترین گروه فیتواستروژن‌ها ایزوفلاون‌ها می‌باشند که تقریباً به طور اختصاصی در خانواده‌ی نخودیان[2] یافت می‌شوند. گیاه سویا که از خانواده‌ی نخودیان است غنی از ایزوفلاون‌ها می‌باشد. جنستئین (4′,5,7-trihydroxyisoflavone) فراوان‌ترین و بیش‌ترین فعالیت بیولوژیکی را در میان ایزوفلاون‌های موجود در سویا را دارا می‌باشد و از لحاظ ساختاری مخصوصاً در حلقه‌ی فنول شباهت زیادی با استرادیول دارد که این ویژگی باعث توانایی اتصال به گیرنده‌های استروژن و پروتئین‌های گیرنده‌ی هورمون‌های جنسی می‌شود (Dixon and Ferreira 2002). محققان افزایش سطح ویتلوژنین را به عنوان یک شاخص فعالیت استروژنیک در ماهیانی که در معرض جنستئین بوده‌اند، به اثبات رسانده‌اند (Bennetau-Pelissero et al. 1991a,b, Inudo et al. 2004, Kausch et al. 2008, Schiller et al. 2014). مطالعات نشان می‌دهد که جنستئین می‌تواند عملکرد هورمون‌های درون‌زاد را با مهار آنزیم‌هایی چون آروماتاز و تیروزین کیناز مختل کند (Chen et al. 1997, Huang et al. 1999, Nagao et al. 2001). در واقع یکی از عملکردهای جنستئین توانایی تأثیر بر پروتئین‌های گیرنده هورمون‌های جنسی و تأثیر روی تنظیم استروئیدوژنز و مقدار هورمون‌های در گردش می‌باشد (Gatlin et al. 2007) و همچنین باعث ایجاد تأثیرات مخرب بر سیستم تولید مثلی حیوانات از جمله ماهیان شده است (Nagao et al. 2001).

به عنوان مثال، تغذیه‌ی ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با جیره‌ی غذایی غنی شده از جنستئین (۰/۵ و ۱ گرم در هر کیلوگرم جیره) به مدت یک سال (از ابتدای گامتوژنز تا زمان تخم‌ریزی) منجر به کاهش سطح هورمون تستوسترون و القای کم اما مستمر ویتلوژنین در جنس نر شد. همچنین در جنس ماده القای ویتلوژنین به طور معنی‌داری افزایش یافت و نهایتاً کاهش لقاح و بازماندگی لاروی مشاهده شد. تخریب عملکرد تولید مثلی ماهیان از طریق تماس با جنستئین در برخی دیگر از ماهیان نیز گزارش شده است که به طور نمونه می‌توان به تأخیر در بلوغ تخم ماهی مداکا (Japanese medaka) (Kiparissis et al. 2003) و القای گنادهای بین جنسی در گربه‌ماهی کانال (channel catfish) (Green and Kelly 2009) و ماده‌سازی در ماهی کفشک جنوبی (southern flounder) (DiMaggio et al. 2016) اشاره کرد. جنستئین که به عنوان یک استروژن ضعیف طبقه‌بندی شده و توانایی بیان ژن استروژن را دارد اما میزان آن با توجه به جنس، گونه، میزان دوز و مدت زمان در تماس، متفاوت است (Latonnelle et al. 2000, Zhang et al. 2002). از طرفی، اکثر مطالعات به بررسی تأثیرات مختل‌کننده‌ی جنستئین بر رشد جنسی ماهیانی که در مرحله‌ی نخست گامتوژنز و یا در کل چرخه تولید مثلی بوده‌اند، پرداخته‌اند اما تعداد آزمایشات در مرحله‌ی نهایی رشد گنادی ماهیان بالغ محدود می‌باشد. علاوه بر این، مطالعات نسبتاً کمی درباره‌ی مکانیسم‌های پیوسته‌ای چون توسعه‌ی گنادی و سطح هورمون‌های استروئیدی وجود دارد. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تزریق فیتواستروژن جنستئین در دو دوز خوراکی (۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن، که به طور طبیعی در جیره‌هایی که نیمی از پروتئین آن حاوی پودر سویا یا کنسانتره پروتئین سویا می‌باشد، یافت می‌شود و ماهیان روزانه در تماس با آن هستند) و فارماکولوژیک یا دوز بالا (۵۰ میکروگرم بر

1- Phytoestrogens
2- Leguminosae

www.SID.ir

Archive of SID

گرم وزن بدن) بر کیفیت گامت‌های تولیدی (شاخص گنادوسوماتیک (GSI)، هم‌آوری نسبی، هم‌آوری مطلق، قطر تخمک)، سطح هورمون‌های استروئیدی (۱۷–بتا استرادیول و تستوسترون) و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون (کلسیم، فسفر، کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین کل) مولدین ماده ماهی قرمز که به عنوان یک مدل مناسب خانواده‌ی کپور ماهیان می‌باشد، انجام شد.

مواد و روش کار

در این آزمایش، ابتدا تعداد ۸۰ عدد ماهی قرمز هم اندازه با وزن تقریبی ۳۰ تا ۴۰ گرم جهت انجام مراحل آزمایش از مرکز تکثیر ماهیان زینتی در استان کردستان تهیه شده و سپس به آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه کردستان–دانشکده‌ی منابع طبیعی منتقل شدند. ماهیان پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید در تانک‌های فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری، به تعداد ۲۰ عدد در هر ونیرو (۴۰۰ لیتری، استوانه‌ای شکل و مجهز به سیستم هوادهی) معرفی شدند. شرایط فیزیکوشیمیایی آب محل نگهداری ماهیان در حد اپتیمم گونه کنترل شد (درجه‌ی حرات آب ۲ ۲۲t درجه‌ی سانتی‌گراد؛ اکسیژن محلول ۰/۰۲ ۷t میلی‌گرم در لیتر؛ نیتریت ۰/۰۱ ۰/۱۲t میلی‌گرم در لیتر؛ سختی کل ۱۵/۱ ۱۸۴/۶t میلی‌گرم در لیتر؛ پی–اچ ۰/۳ ۸/۲t). سیستم آبرسانی به تانک‌های نگهداری ماهیان متصل به آب لوله‌کشی شهری (شهر سنندج) بود و آب مورد استفاده قبل از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره‌ی آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی گردید. ماهیان به مدت ۲ ماه تا زمان رسیدن بلوغ جنسی تحت پرورش در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی (12L:12D) قرار گرفتند و روزانه ماهیان به مقدار ۳ درصد وزن بدن و در دو وعده‌ی غذایی در روز با غذای مخصوص ماهی قرمز (انرژی–ساخت کشور تایلند) شامل : ۳۳/۷۱ درصد پروتئین خام، ۸/۴۱ درصد چربی خام، ۹/۲۱ درصد خاکستر و ۲/۹۲ درصد فیبر خام تغذیه شدند.

در ابتدای فصل بهار و در مرحله بلوغ رسیدگی جنسی، مولدین نر و ماده از یکدیگر جدا شدند. تشخیص مولدین نر و ماده با مشاهده‌ی علائم خارجی رسیدگی جنسی صورت گرفت. به گونه‌ای که تشخیص مولدین نر بالغ از طریق فشار به ناحیه‌ی شکمی و خارج شدن اسپرم و همچنین وجود دانه‌های زبر و مرواریدی شکل روی سرپوش آبششی و قسمت فوقانی باله‌ی سینه‌ای صورت گرفت. در صورتی که مولدین رسیده ماده واجد شکم نرم و برآمده می‌باشند. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل، مولدین ماده به صورت جداگانه به ۴ تیمار (۲ تکرار برای هر تیمار و ۱۰ عدد مولد در هر تکرار) تقسیم شدند. در شروع آزمایش، جنستئین (خلوص بالای ۹۸ درصد، کمپانی Sigma-Aldrich) و هورمون ۱۷ بتا استرادیول (خلوص بالای ۹۸ درصد، کمپانی Sigma-Aldrich) در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل و سپس به نسبت ۱:۳ با روغن ذرت رقیق شدند (Cleveland and Manor 2015). در ادامه‌ی ماهیان مولدین ماده با ۲ دوز ۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن (G5) و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن جنستئین (G50)، ۱۰ میکروگرم بر گرم وزن بدم هورمون ۱۷بتا–استرادیول (E2) و گروه کنترل (CTRL) ۱۰ میکروگرم بر گرم روغن ذرت + DMSO یک روز در میان به مدت ۱۰ روز قبل از تخم‌گیری تحت تزریق عضلانی قرار گرفتند (Zhang et al. 2002, Cleveland and Manor 2015).

۱۰ روز پس از اولین تزریق، ماهیان با پودر گل میخک به میزان ۱۵۰ppm بیهوش شدند. در ادامه خون‌گیری و خارج‌سازی گناد نیمی از ماهیان هر تیمار انجام شد. خون‌گیری از ساقه‌ی دمی ماهیان به منظور اندازه‌گیری استروئیدهای جنسی (تستوسترون و ۱۷بتا–استرادیول)، شاخص‌های بیوشیمیایی (کلسیم، فسفر، کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین کل) سرم خون صورت گرفت. یک

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت پس از لخته شدن نمونه‌های خون، با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (Eppendorf 5810 R, Germany) (در دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی-گراد) سرم از خون جدا شد. سپس سرم به ویال‌هایی که مشخصات مربوط به ماهی و مرحله‌ی آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شده بود، انتقال یافت و در دمای زیر انجماد (۲۱- درجه‌ی سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند. بعد از انجام خون-گیری، به منظور اندازه‌گیری شاخص گنادوسوماتیک (GSI)، پس از باز نمودن محوطه‌ی شکمی ماهیان گنادها خارج و داخل پتری دیش قرار گرفتند و توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند. نهایتاً شاخص گنادوسوماتیک بر اساس رابطه‌ی ۱۰۰× (وزن بدن (گرم) /وزن گناد (گرم) =GSI) تعیین گردید.

به منظور تعیین تأثیر جنستئین یا هورمون ۱۷بتا-استرادیول بر کیفیت تخمک، نیمی دیگر از ماهیان تحت تزریق ۰/۵ میکرولیتر بر گرم هورمون sGnRHa قرار گرفتند. ۱۲ ساعت پس از تزریق sGnRHa منفذ تناسلی و بدن ماهیان ماده توسط حوله، خشک شده و با فشار ملایم به ناحیه‌ی شکمی از ماهیان تخم‌کشی به عمل آمد. قطر تخمک بر حسب میلی‌متر توسط لوپ مدرج، هم-آوری مطلق (کل تخمک‌های تولید شده) و هم‌آوری نسبی (تخمک‌های تولیدی/وزن بدن (گرم)) مولدین ماده اندازه‌گیری شد.

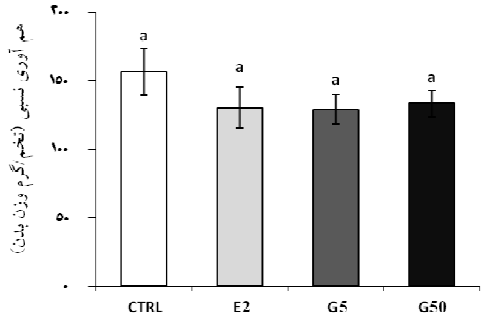
جهت اندازه‌گیری استروئیدهای جنسی و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون سطح تستوسترون و ۱۷بتا-استرادیول سرم خون به ترتیب توسط کیت‌های تجاری (Demeditec Diagnostics GmbH, Germany) و (IBL International GmbH, Germany) و با استفاده از دستگاه الایزا اندازه‌گیری شدند. همچنین اندازه‌گیری شاخص-های بیوشیمیایی (کلسیم، فسفر، کلسترول، تری‌گلیسرید پروتئین کل) سرم خون، نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (SECOMA, NorthStar, Scientific Ltd; 229 UK) و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (Pars Azmun Co. Ltd., Tehran, Iran) مطابق با روش کار پیشنهاد شده کارخانه مربوطه مورد سنجش قرار گرفتند.

داده‌ها پس از کنترل همگنی آن‌ها به وسیله‌ی آزمون لون[1] توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون توکی[2] در سطح ۹۵ درصد (۰/۰۵ =α)، به عنوان POST HOC، جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی کلیه‌ی داده‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار spss (SPSS 16, Chicago, IL) و رسم نمودارها در فضای نرم‌افزاری Exell انجام شد. داده‌ها در نتایج به صورت میانگین t خطای استاندارد (Mean±S.E) بیان شده است.

نتایج

هم‌آوری نسبی، هم‌آوری مطلق و قطر تخمک

مطابق شکل ۱، ۲ و ۳ به ترتیب هم‌آوری نسبی (F=۰/۹۹۲ و P=۰/۴۴)، هم‌آوری مطلق (F=۰/۰۳۷ و P=۰/۹۹) و قطر تخمک (F=۰/۵۵۹ و P=۰/۶۴) در میان تیمارهای E2 (۱۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۱۷بتا-استرادیول) و جنستئین (۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن=G5 و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن=G50) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

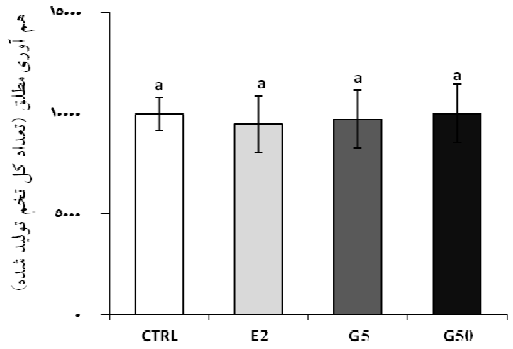


شکل ۱: مقایسه داده‌های (میانگین ± خطای استاندارد) هم-آوری نسبی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز (n=۸) (حرف انگلیسی یکسان بیان‌گر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

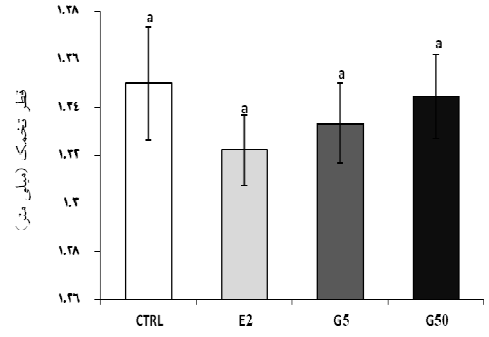
1- Levene's tests
2- Tukey's test

www.SID.ir

Archive of SID



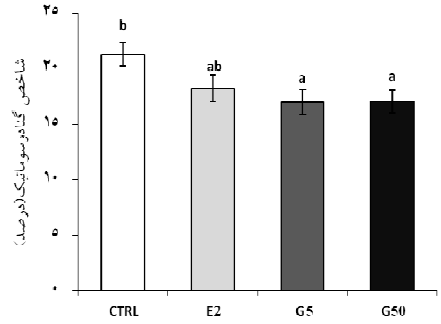
شکل ۲: مقایسه‌ی داده‌های (میانگین ± خطای استاندارد) هم-آوری مطلق بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز (n=۸) (حرف انگلیسی یکسان بیان‌گر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۳: مقایسه‌ی داده‌های (میانگین ± خطای استاندارد) قطر تخمک بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز (n=۴۵) (حرف انگلیسی یکسان بیان‌گر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

شاخص گنادوسوماتیک جنس ماده

مقایسه‌ی تغییرات تیمارهای مختلف حاکی از کاهش قابل توجه شاخص گنادوسوماتیک در دو تیمار G5 و G50 در مقایسه با گروه کنترل (CTRL) می‌باشد (F=۴/۱۹۲ و P=۰/۰۱، شکل ۴).



شکل ۴: مقایسه‌ی داده‌های (میانگین ± خطای استاندارد) شاخص گنادوسوماتیک بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز (n=۸) (حرف انگلیسی غیر یکسان بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد)

سطح هورمون‌های استروئیدی (تستوسترون و ۱۷-بتا استرادیول) و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون مولدین ماده ماهی قرمز

مطابق جدول ۱، مقدار هورمون ۱۷بتا-استرادیول سرم خون ماهیان ماده در تیمارهای E2 و G50 افزایش معنی-داری را در مقایسه با تیمار G5 و گروه کنترل نشان داد. همچنین نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تنها غلظت بالای جنستئین (G50) و E2 شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون را تغییر دادند. به گونه‌ای که سطح فسفر، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم خون ماهیان ماده در تیمارهای G50 و E2 به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین تغییری در سطح کلسیم و پروتئین کل سرم خون در تیمارهای جنستئین و E2 مشاهده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: هورمون‌های استروئیدی و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون مولدین ماده ماهی قرمز (میانگین±خطای استاندارد)

متغییر	CTRL	E2	G5	G50	F	p-value
تستوسترون (ng/ml)	۵/۵۳±۰/۳۷^{c}	۱/۳۰±۰/۲۳^{b}	۲/۰۵±۰/۴۴^{a}	۰/۸۱±۰/۰۶^{a}	۴۷/۳۰	۰/۰۰۱
۱۷- بتا استرادیول (ng/ml)	۲/۳۱±۰/۱۷^{a}	۴/۶۵±۰/۳۱^{b}	۲/۱۳±۰/۲۵^{a}	۵/۵۲±۰/۵۸^{b}	۲۲/۰۷	۰/۰۰۱
کلسیم ((mg/dl)	۱۶/۰۷±۰/۶۳^{a}	۱۷/۲۲±۰/۷۲^{a}	۱۷/۴۸±۰/۲۹^{a}	۱۶/۰۳±۰/۵۹^{a}	۱/۱۱۷	۰/۳۸
فسفر (mg/dl)	۲۴/۱۴±۰/۴۶^{a}	۴۰/۶۵±۱/۰۶^{b}	۲۶/۴۶±۰/۴۵^{a}	۴۷/۳۲±۲/۲۹^{c}	۵۰/۶۸	۰/۰۰۱
کلسترول (mg/dl)	۱۹۵/۴±۵/۸۶^{a}	۲۷۸/۲۳±۶/۹۳^{b}	۱۲۷/۶۵±۲/۶۶^{a}	۳۷۲/۶۴±۱۰/۳۴^{c}	۵۶/۱۳	۰/۰۰۱
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۲۱۰/۷۴±۶/۴۷^{a}	۲۶۴/۳۰±۵/۷۷^{b}	۲۱۷/۶۰±۵/۷۰^{a}	۲۷۹/۶۳±۲/۲۳^{b}	۲۱/۷۵	۰/۰۰۱
پروتئین کل (g/dl)	۳/۹۰±۰/۲۲^{a}	۴/۶۳±۰/۱۹^{a}	۳/۹۲±۰/۱۴^{a}	۴/۴۶±۰/۲۱^{a}	۲/۱۲۹	۰/۱۵

حروف انگلیسی مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی می‌باشد (P□۰/۰۵).

بحث

توانایی فیتواستروژن‌ها به اتصال و فعالیت در گیرنده-های استروژن به خوبی تعریف شده است و بیان می‌کند که این مواد از عوامل برون‌زا و خارجی هستند که باعث اختلال در سنتز، آزادسازی، انتقال، متابولیسم، اتصال یا حذف هورمون‌های طبیعی در بدن و ایجاد اختلال در تولید مثل می‌شوند. تماس با این ترکیبات ممکن است با بر هم زدن جنبه‌های مختلفی از تولید مثل، مانند رشد و توسعه جنسی، زمان بلوغ، رفتارهای جنسی، تولید گامت، عملکرد غدد درون‌ریز بیضه و تخمدان، عملکرد تولید مثلی را تغییر دهند (Cederroth et al. 2012). در مطالعه‌ی حاضر تأثیر کوتاه مدت جنسئین به عنوان فراوان‌ترین فیتواستروژن سویا در غلظت‌های خوراکی و فارماکولوژیک مورد سنجش قرار گرفت و تیمار E2 نیز به منظور مقایسه‌ی تأثیرات استروژنیک جنسئین استفاده شد. در چندین بررسی کاهش میزان هم‌آوری ماهیان در معرض ترکیبات استروژنیک مشخص شده است. به عنوان مثال، تماس مولدین ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) با هورمون ۱۷بتا-استرادیول به مدت ۳ هفته نشان داد که با افزایش دوز E2 میزان هم‌آوری کاهش می‌یابد (Kang et al. 2002). اما در مطالعه‌ی حاضر تغییری در میزان هم‌آوری ایجاد نگردید. این نتیجه می‌تواند به علت واریانس‌های نسبتاً بالای مشاهده شده در این پارامتر (خطای استاندارد ۱۲۷۸/۲۱ تخم) و تعداد کم ماهیان مورد آزمایش باشد. همچنین شاخص گنادوسوماتیک ماهیان ماده در تیمارهای جنسئین کاهش معنی‌داری را نشان داد اما هم‌آوری و قطر تخمک تحت تأثیر قرار نگرفت. این عدم ارتباط بین شاخص گنادوسوماتیک و هم‌آوری و قطر تخم می‌تواند به علت زمان استفاده از جنسئین در ماهیان باشد. در واقع زمانی ماهیان تحت تزریق جنسئین قرار داده شدند که زرده‌سازی به مقدار قابل توجهی در تخم‌ها اختصاص یافته بود. Sepehr و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی تأثیر تزریق غلظت‌های مختلف جنسئین بر بافت تخمدان ماهی نابالغ گورامی، دریافتند که تماس این ماهی با ۰/۱۵ میلی‌گرم بر گیلوگرم وزن بدن جنسئین، منجر به ایجاد اثرات استروژنیک در این ماهی گردیده به گونه‌ای که تخمدان این گروه از ماهیان از لحاظ رشد و نمو یک مرحله جلوتر از گروه کنترل بود. از طرفی، استفاده از ۱۵ میلی‌گرم بر گیلوگرم وزن بدن جنسئین، نه تنها به رشد اووسیت‌ها کمک نکرده است، بلکه از رشد آن جلوگیری کرده و اووسیت‌های دژنره نیز در این گروه گزارش شد.

جنسئین به عنوان آگونیست و آنتاگونیست هورمون ۱۷بتا-استرادیول در چندین گونه از ماهیان ثابت شده و به نظر می‌رسد این دو اثر تحت تأثیر نسبت استرادیول و جنسئین در اندام هدف هستند (Zhang et al. 2002).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق ۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن جنستئین تنها می‌تواند سطح هورمون تستوسترون سرم خون ماهیان ماده را کاهش دهد. هرچند در تیمارهای E2 و G50 به طور معنی‌داری سطح تستوسترون سرم خون کاهش و سطح هورمون ۱۷بتا-استرادیول سرم خون افزایش یافت که به طور کلی با تغییرات در سطح غلظت استروئیدهای پلاسما در گونه‌های دیگر مطابقت دارد. به عنوان مثال Bennetau- Pelissero و همکاران در سال ۲۰۰۱، اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز را توسط جنستئین در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان کردند که در زمان رشد اولیه اوسیت‌ها (قبل از زرده‌سازی) وقتی که سطح هورمون ۱۷بتا-استرادیول سرم خون کم است، جنستئین دارای تأثیرات استروژنیک بوده که با افزایش ویتلوژنین آن را نشان داد. اما در بین دو مرحله‌ی پیش ویتلوژنین و ویتلوژنین که سطح ۱۷بتا-استرادیول بالا می‌باشد تأثیرات استروژنیک در ماهیان تغذیه کننده از جنستئین مشاهده نشد و از طرفی، پیش ویتلوژنین در این گروه متوقف گردید. محققان بیان کردند که احتمال دارد جنستئین با اعمال تأثیرات آنتی‌استروژنیک اثر منفی برجسته‌ای روی گامتوژنز اعمال کند. در مراحل انتهای ویتلوژنین و تخم‌ریزی زمانی که سطح استرادیول کاهش می‌یابد، جنستئین فعالیت استروژنیک خود را دوباره اعمال کرده و به صورت سطوح بالای ویتلوژنین آن را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر نیز ثابت شد که اختلال در فیزیولوژی تولیدمثل ماهی قرمز در نتیجه‌ی عملکرد جنستئین، با کاهش سطح تستوسترون سرم خون در تیمار G5 و افزایش سطح هورمون ۱۷بتا-استرادیول و کاهش سطح هورمون تستوسترون سرم خون ماهیان ماده در تیمارهای G50 و E2 ایجاد می‌شود. همچنین این نتیجه می‌تواند تأثیرات استروژنیک جنستئین را در غلظت‌های بالا در این مرحله رسیدگی جنسی در ماهی قرمز اثبات کند. در یک تحقیق که ماهیان بالغ مداکا (*O. ltipes*) تحت تزریق جنستئین قرار گرفتند، نتایج نشان از عدم القای ویتلوژنین در ماهیان نر و ماده بود، اما سطح هورمون ۱۷بتا-استرادیول پلاسما در ماهیان ماده‌ای که در معرض جنستئین بودند افزایش و سطح تستوسترون پلاسما در ماهیان نر کاهش یافت (Zhang et al. 2002) که موافق با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد ماهیانی که در معرض جنستئین و E2 هستند، با افزایش سطح E2 میزان هورمون تستوسترون سرم خون کاهش معنی‌داری می‌یابد. احتمالاً افزایش سطح هورمون ۱۷بتا-استرادیول در تیمارهای E2 و G50 به علت انباشتگی این هورمون در شرایطی که ماهی از لحاظ فیزیولوژیک نیاز کم‌تری به این هورمون در این مرحله رسیدگی جنسی دارد، مربوط باشد. از طرفی، هورمون ۱۷بتا-استرادیول به عنوان یک هورمون شاخص در جنس ماده اثر متقابل بر هورمون تستوسترون که یک هورمون شاخص در جنس نر می‌باشد را دارا است. مطالعات محققین حاکی از آن است که جنستئین از طریق مکانیسم‌های متعددی باعث اختلال در استروئیدوژنز می‌شود. به عنوان مثال، مشخص شده که جنستئین می‌تواند باعث کاهش انتقال کلسترول در سرتاسر غشای میتوکندری و در نتیجه‌ی آن کاهش سطح آندروژن‌ها شود (Stevenson et al. 2011) و یا ممکن است باعث اختلال در آنزیم‌های استروئیدساز شود (Adlercreutz et al. 1993) به گونه‌ای که محققین مهار آنزیم‌های ۳بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز و ۱۷بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز در سلول‌های میکروزوم جفت انسان را توسط جنستئین نشان داده‌اند (Le Bail et al. 2000).

پروفایل بیوشیمیایی پلاسمای خون‌نشان‌دهنده‌ی کیفیت محیط داخلی بدن می‌باشد (Svoboda et al. 2001). در واقع شاخص‌های بیوشیمیایی خون در اثر بیماری، تماس با مواد شیمیایی و سموم و یا شرایط استرس‌زا و همچنین وضعیت تولید مثلی موجود زنده تغییر می‌کنند. بنابراین می‌توانند اطلاعات مهمی را در مورد وضعیت عملکرد اندام‌های مختلف بدن فراهم کنند (Sheridan et al. 1983). در مطالعه حاضر نیز دو شاخص کلسیم و فسفر به عنوان نماینده‌های ویتلوژنین

www.SID.ir

Archive of SID

(Singh and Srivastav Ajai 1990). اندازه‌گیری شدند. هر چند که غلظت کلسیم در هیچ یک از تیمارها تغییری نکرد اما سطح فسفر سرم خون در تیمارهای E2 و G50 افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و G5 نشان داد. این بیان‌کننده‌ی آن است که E2 و غلظت‌های بالای جنستئین ممکن است اثرات استروژنیک را در این مرحله رسیدگی جنسی در ماهی قرمز اعمال کنند. همچنین در این مطالعه سطح فسفر و کلسترول سرم خون در تیمارهای E2 و G50 افزیش معنی‌داری را نشان داد اما غلظت پروتئین کل بدون تغییر باقی ماند. Pelissero-Bennetau و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که تغذیه‌ی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان از جیره‌های حاوی جنستئین به مدت یک سال (آغاز گامتوژنز تا زمان تخم-ریزی) تغییری در کلسترول پلاسمای خون ماهیان ماده ایجاد نمی‌کند. با این حال مطالعات متعدد دیگری نیز در زمینه‌ی تأثیرات ترکیبات استروژنیک بر سطح کلسترول و تریگلیسرید پلاسمای خون ماهیان انجام شده است. به عنوان مثال Sharpe و MacLatchy در سال ۲۰۰۷ در یک دوره‌ی ۵ ماهه از طریق کاشت کپسول‌های جامد سیلاستیکی در مولدین ماهی قرمز را تحت ۱۰ میکروگرم E2 به ازای گرم وزن بدن قرار دادند. نتایج نشان داد که تغییرات چربی پلاسمای ماهیان مولد نسبت به E2 به پارامترهای محیطی مانند دما وابسته است. به گونه‌ای که سطح کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما به طور معنی‌داری افزایش یافت و این افزایش همزمان با افزایش دما و فتوپریود بود. همچنین افزایش در سطح کلسترول کل و تری‌گلیسرید پلاسما در ماهیان جوان کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) که از جیره‌های حاوی ۰/۳۵ و ۰/۷ درصد ایزوفلاون سویا به مدت ۱۰ هفته تغذیه کرده بودند را نیز گزارش شده است (Deng et al. 2012). از طرفی نتایج شبه استروژنی جنستئین بیان کننده آن است که میزان لیپیدهای پلاسما، به در معرض بودن با دوزهای بالای جنستئین (۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن) حساسند به گونه‌ای که افزایش مشابه در سطح تری‌گلیسرید و کلسترول در مقایسه با تیمار E2 این موضوع را تأیید می-کند.

نتایج این مطالعه نشان داد که تماس کوتاه مدت مولدین ماده ماهی قرمز با ۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن جنستئین (به عنوان دوز خوراکی که ممکن است ماهی روزانه در تماس با آن باشد)، اختلالی در کیفیت گامت-های تولیدی، شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون و سطح هورمون ۱۷بتا–استرادیول آن‌ها ایجاد نمی‌کند اما منجر به اختلال در سطح طبیعی هورمون تستوسترون می‌گردد. از طرفی تماس ماهیان با غلظت بالای جنستئین (۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) و E2 اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون را به وضوح نشان داد که این نتیجه اثرات استروژنیک جنستئین را در غلظت‌های بالا ثابت می‌کند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر بر این نکته تأکید دارد که باید از عدم وجود غلظت‌های بالای ترکیبات استروژنی در جیره‌های غذایی ماهی به منظور عدم ایجاد اختلال در سیستم درون‌ریز ماهیان ماده و موفقیت در تولید مثل اطمینان حاصل نمود و با توجه به این که هدف اصلی، موفقیت در تولیدمثل است و میزان تأثیر جنستئین بستگی به غلظت، مدت تماس، نوع گونه و مرحله‌ی رسیدگی جنسی ماهیان دارد، باید وجود جنستئین در جیره‌های غذایی ماهیان مولد تجاری مورد بررسی لازم قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از خانم دکتر فرزانه وردی و مهندس حمید محمدی (آزمایشگاه تشخیص طبی وردی (سنندج)) به سبب همکاری در اجرای این تحقیق اعلام داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Adlercreutz, H.; Bannwart, C.; Wahala, K.; Makela, T.; Brunow, G.; Hase, T. et al. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 44: 147-53.

Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B.; Bennetau, B.; Corraze, G.; Le Menn, F.; Davail-Cuisset, B. et al. (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.

Bennetau-Pelissero, C.; Arnal-Schnebelen, B.; Lamothe, V.; Sauvant, P.; Sagne, J.L.; Verbruggen, M.A. et al. (2003). ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. Food Chemistry, 82: 645-658.

Bjerselius, R.; Lundstedt-Enkel, K.; Olse´n, H.; Mayer, I. and Dimberg, K. (2001). Male goldfish reproductive behavior and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17β-estradiol. Aquatic Toxicology, 53: 139-152.

Cederroth, C.R.; Zimmermann, C. and Nef, S. (2012). Soy phytoestrogens and their impact on reproductive health. Molecular and Cellular Endocrinology, 355: 192-200.

Chen, S.; Kao, Y.C. and Laughton, C.A. (1997). Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 61: 107-115.

Cleveland, B.M. and 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.

Deng, J.M.; Mai, K.S.; Ai, Q.H.; Zhang, W.B.; Wang, X.J.; Xu, W. et al.(2012). Effects of antinutritional factors on plasma lipoprotein levels in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fish Biology, 80: 286-300.

DiMaggio, M.A.; Kenter, L.W.; Breton, T.S. and Berlinsky, D.L. (2016). Effects of dietary genistein administration on growth, survival and sex determination in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. Aquaculture Research, 47: 82-90.

Dixon, R.A. and Ferreira, D. (2002). Genistein. Phytochemistry, 60: 205-211.

Francis, G.; Makkar, H.P.S. and Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, 199: 197-227.

Gatlin III, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.; Dabrowski, K.; Gaylord, T.G.; Hardy, R.W. et al. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products inaquafeeds: a review. Aquaculture Research, 38: 551-579.

Green, C. and 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.

Huang, R.Q.; Fang, M.J. and Dillon, G.H. (1999). The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors. Molecular Brain Research, 67:177-183.

Inudo, M.; Ishibashi, H.; Matsumura, N.; Matsuoka, M.; Mori, T.; Taniyama, S. et al. (2004). Effect of estrogenic activity, and phytoestrogen and organochlorine pesticide contents in an experimental fish diet on reproduction and hepatic vitellogenin production in medaka (*Oryzias latipes*). Comparative Medicine, 54: 673-680.

Kang, I.J.; Yokota, H.; Oshima, Y.; Tsuruda, Y.; Yamaguchi, T.; Maeda, M. et al. (2002). Effect of 17β-estradiol on the reproduction of 557 Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere, 47: 71-80.

Kausch, U.; Alberti, M.; Haindl, S.; Budczies, J. and Hock, B. (2008). Biomarkers for exposure to estrogenic Compounds: gene expression analysis in Zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology, 23:15-24.

Kaushik, S.J.; Cravedi, J.P.; Lalles, J.P.; Sumpter, J.; Fauconneau, B. and 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.

Kiparissis, Y.; Balch, G.C.; Metcalfe, T.L. and Metcalfe, C.D. (2003). Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka, (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives, 111: 1151-1163.

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

Le Bail, J-C.; Champavier, Y.; Chulia, A.J. and Habrioux, G. (2000). Effects of phytoestrogens on 574 aromatase, 3β and 17β-hydrosteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. Life Science, 66: 1281-1291.

Lehtinen, K.J.; Mattsson, K.; Tana, J.; Engström, C.; Lerche, O. and Hemming, J. (1999). Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 42: 40-49.

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

Noble, E.; Demaël, A.; Garin, D.; Moulin, C. and 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.

Pelissero, C.; Bennetau, B.; Babin, P.; Le Menn, F. and Dunogues, J. (1991a). The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 38: 292-299.

Pelissero, C.; Le Menn, F. and Kaushik, S. (1991b). Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. General and Comparative Endocrinology, 83: 447-457.

Refstie, S.; Baeverfjord, G.; Seim, R.R. and 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.

Schiller, V.; Zhang, X.; Hecker, M.; Schafers, C.; Fischer, R. and Fenske, M. (2014). Species-specific considerations in using the fish embryo test as an alternative to identify endocrine disruption. Aquatic Toxicology, 155: 62-72.

Sepehr, M.; Oryan , S.; Naji, T. and Yaghmayee, P. (2015). Investigation in histological effects of genistein on the ovarian tissue of fish three spot gourami (*Trichogaster trichopterus*). Journal of Oceanography, 6(23): 9-17.

Sharpe, R.L. and MacLatchy, D.L. (2007). Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: effects of β-sitosterol and 17β-estradiol exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, 145: 507-517.

Sheridan, M.A.; Allen, W.V. and Kerstetter, T.H. (1983). Seasonal variations in the lipid compositions of the steelhead trout, *Salmo gairdneri* Richardson, associated with the parr-smolt transformation. Journal of Fish Biology, 23: 125-134.

Singh, S. and Srivastav Ajsi, K. (1990). Changes in the serum calcium and phos-phate levels in relation to the annual reproductive cycle of the fresh water catfish, *Heteropneustes fossilis*. Boletim de Physiologie Animale, 14: 81-86.

Stevenson, L.M.; Brown, A.C.; Montgomery, T.M. and Clotfelter, E.D. (2011). Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60: 501-510.

Svoboda, M.; Kouril, J.; Hamackova, J.; Kalab, P.; Savina, L.; Svobodova Z. and Vykusova, B. (2001). Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca L.*) during pre- and postspawning period. Acta Veterinary Brno, 70: 259-268.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of genistein on gamete quality, steroidogenesis and serum biochemicals in goldfish (*Carassius auratus*)

Nezafatian, E.[1] and Zadmajid, V.[2]

Received: 09.11.2016 Accepted: 22.04.2017

Abstract

The objective of the present investigation was to determine the effects of genistein and 17β-estradiol (E2) on reproductive physiology in female goldfish *(Carassius auratus)* during pre-spawning phase. Female goldfish were received intraperitoneal injections of E2 (10 μg/g body weight), one of two genistein doses (5 μg/g body weight, G5, or 50 μg/g body weight, G50), or the injection vehicle (CTRL) every other day for 10 days prior to spawning. Disruptions in reproductive capacity were determined by measuring indices of oocyte quality, serum metabolites and sex steroids. Genistein reduced GSI but did not affect on fecundity and oocyte diameter. E2 and genistein (G5 and G50) reduced plasma T, while plasma E2 significantly increased at G50 and E2 treatment groups in comparison to the G5 and the control groups. Plasma biochemical indexes (phosphorus, cholesterol and triglyceride) were significantly were elevated by genistein (G50) and E2 treatment. These findings suggesting that high dietary genistein may impair endocrine system of fishes and finally impair their reproductive performance.

Key words: Genistein, Sex steroids, Biochemical indexes, Gamete quality, Goldfish

1- MSc Graduated of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Fisheries Science, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
Corresponding Author: Zadmajid, V., E-mail: v.zadmajid@uok.ac.ir

www.SID.ir