شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۶۱-۴۵۲

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. استاد 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

فیتوا ستروژن‌ها ترکیباتی طبیعی با ظرفیت تغییر عملکرد یا ساختار سی ستم غدد درون‌ریز و تولیدمثل در آبزیان ه ستند که در بی شتر محیط‌های آبی یافت می‌گردند. در این تحقیق، اثر دو فیتواستروژن بر برخی شاخص‌های تولید مثلی (هورمونی: تستوسترون و ۱۷بتا-ا سترادیول، یونی: کل سیم 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 ۵۰۰، ۵۰ 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 ۱۷بتا-استرادیول و فعالیت آروماتاز می‌گردد. سطح بالای بتاسیتوسترول نیز سبب افزایش میزان تستوسترون و فعالیت EROD شد. هر دو فیتواسترژن بر میزان کلسیم تاثیر معنی‌داری نشان ندادند. طبق یافته‌های این تحقیق، جنیستئین در غلظت‌های بالا (۵۰۰ نانوگرم بر لیتر) می‌تواند به‌عنوان محرک سیستم غدد درون ریز عمل نموده و سبب تغییر در سطح هورمون‌های استرویئدی بویژه ۱۷بتا-استرادیول و فعالیت آروماتازی گردد. 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 درون ریز 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 تاثیر منفی داشته باشد.

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

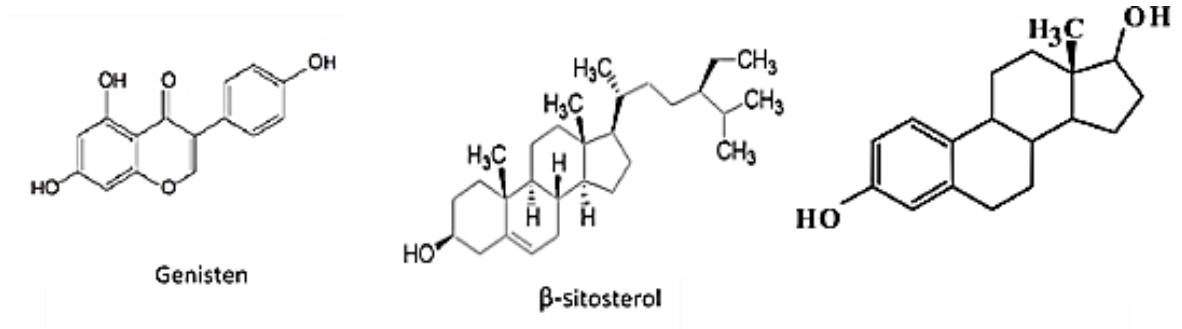
* نویسنده مسوول: تلفن: ۰۴۴+۹۸۲۶۳۲۲۲۳ ایمیل: bmamiri@ut.ac.ir

۱. مقدمه

استروژن‌های بیرونی (Xenoestrogen)، زیر مجموعه‌ای از مواد شیمیایی هستند که یک گروه از ترکیبات زیست محیطی مهم شناخته شده و یکی از ترکیبات برهم زننده غدد درون ریز (EDC= Endocrine disrupting chemicals) را تشکیل می دهند. 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، دریاچه ها و آب‌های دیگر از طریق تجمع رسوب تخلیه می شوند، 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 درون‌ریز 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 زننده‌های هورمونی عمل نموده و سبب ایجاد دو جنسیتی در ارگانیسم‌های آبزی می‌گردند (Ze-hua Liu *et al.*, 2010). در میان فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها جنیستئین 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 اخلال 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.*, 2010b). به‌دلیل 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 استرویئدی جنسی نظیر تستوسترون، 11KT و ۱۷بتا- استرادیول و سطح آن‌ها در پلاسما تاثیر گذار باشند (Stevenson *et al.*, 2011). سیتوکروم‌های P450 خانواده بزرگی از پروتیئن‌های خونی بوده که برای متابولیسم استروژن ضروری هستند. در میان آنها CYP1A و اتوکسی‌رزرفین-اُ-دتیلاز (lase EROD=Ethoxyresorufin-O-dee thy) به‌عنوان مهم‌ترین شاخصه‌های زیستی برای درمعرض قرار گیری آبزیان در برابر انواع آلاینده‌های آلی و ترکیبات شبه استروژنی در نظر گرفته می‌شود. یافته های آزمایشگاهی تاثیر جنیستئین بر مهار فعالیت EROD را بیان کرده‌اند (Green and Kelly, 2009).

تاثیر پساب کارخانه کاغذ سازی و مواد شیمیایی برهم زننده 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 platorynchus*) 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). به‌دلیل دخالت این ترکیبات در مسیر سنتز هورمون‌های استرویئدی 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



شکل ۱ - ساختار شیمیایی جنیستئین، بتاسیتوسترول و استرادیول.

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 رودکوچ 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 اثرات 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 ۱۵±۶۸۰ گرم، از رودخانه شیرود شهرستان تنکابن (°36°51'N-50 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 جنیستئین و ۳ سطح بتاسیتوسترول با غلظت‌های (۵۰۰، ۵۰ و ۱۰ نانوگرم بر لیتر) (شرکت سیگما آلدریچ- 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 جنیستئین و بتاسیتوسترول 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 کیت های هورمونی (کمپانی ویداس (vidas)، کشور فرانسه) و کلسیم به روش کلریمیتریک 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

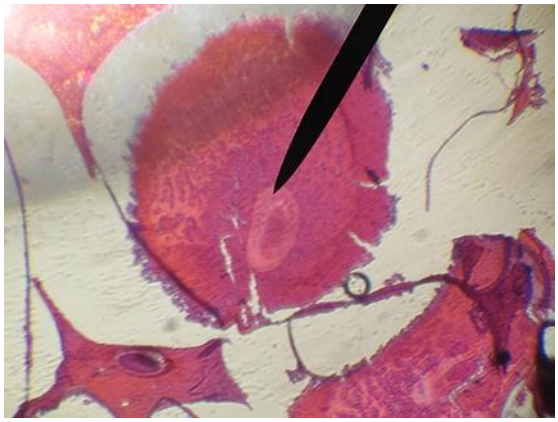
مولار EDTA حل و در سه مرحله با سانتریفیوژ افتراقی به ترتیب ۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰۰×g به مدت ۶۰ دقیقه از سانتریفیوژ و میکروزم کبدی جهت سنجش القاء EROD به‌دست آمد. محلول میکروزمی توسط کیت EROD مخصوص ماهی کمپانی (Bioassay Technology Laboratory، کشور چین) سنجیده و بر حسب پروتئین کل بیان گردید (Karimzadeh *et al.*, 2012). چون برای تعیین میزان فعالیت آروماتاز و EROD نیاز به پروتین کل خون می‌باشد، مقدار آن در همه گروه‌ها سنجیده 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 بتاسیتوسترول، 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 ($P<۰/۰۵$). در مولدین تیمار شده نیز غلظت‌های تعیین شده اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

در تیمارهای حاوی بتاسیتوسترول اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$)

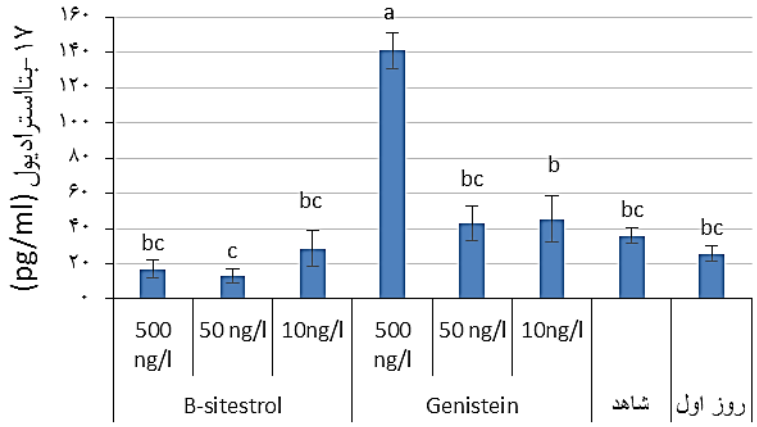


شکل ۱ - و ضعیت تخمدان مولدین ماهی سفید دریای خزر قبل از شروع آزمایش (بزرگ نمایی X40).

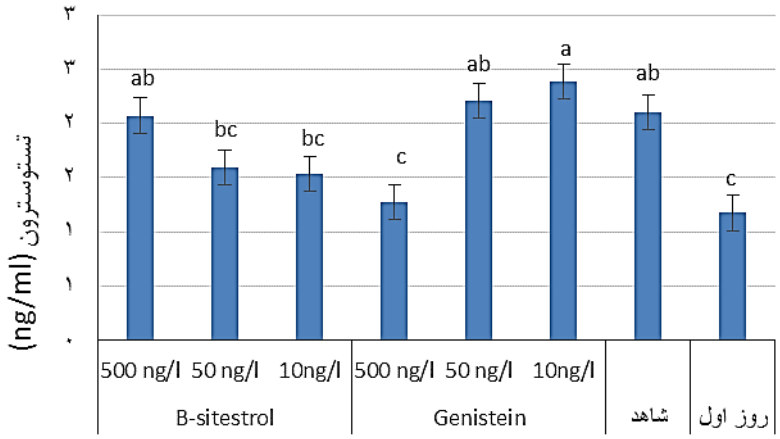
(نمودار ۲). هرچند که با افزایش میزان غلظت بتاسیتوسترول میزان تستسرون نیز افزایش یافت. کمترین میزان غلظت هورمون تستوسترون در مولدین در معرض جنیستئین ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر مشاهده شد. برخلاف بتاسیتوسترول، غلظت‌های مختلف جنیستئین بر روی مولدین اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). در مولدین در معرض جنیستئین 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 ویتلوژنزیز سنجیده شد. نمودار ۳ تغییرات غلظت کلسیم را تحت تاثیر تیمارهای مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول نشان می‌دهد. در کلیه تیمارها، اختلاف معنی‌داری در سطح کلسیم خون مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$). 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.

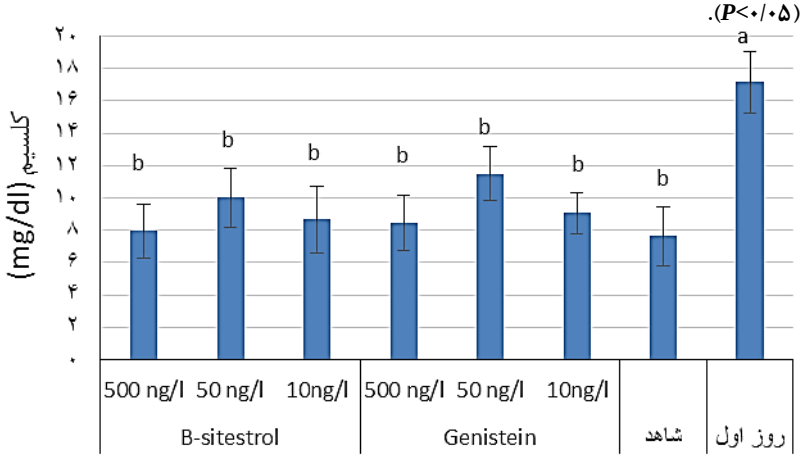
فعالیت آروماتاز تخمدان در مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتاسیتوسترول اختلاف معنی‌داری را در سطح تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان فعالیت آروماتازی در مولدین در معرض جنیستئین ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر و کمترین آن در مولدین در معرض ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر به‌دست آمد (نمودار ۴). در مقایسه با شاهد و روز



نمودار ۱ - تغییرات میزان ۱۷ بتا-استرادیول در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتا سیتو سترول 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<۰/۰۵).



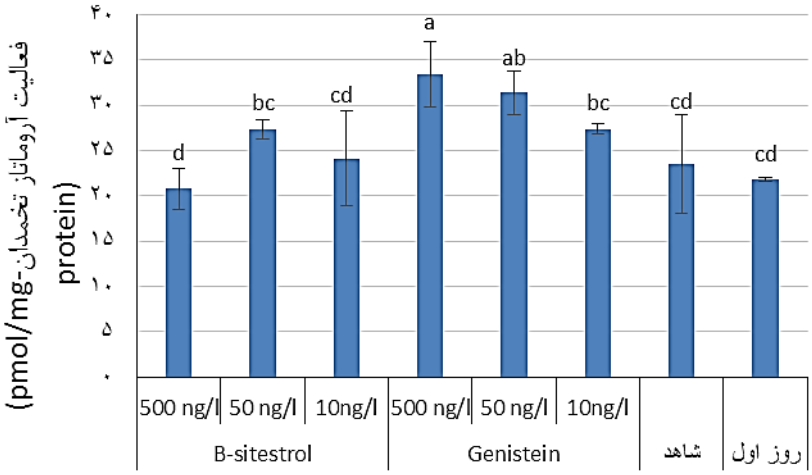
نمودار ۲ - تغییرات میزان هورمون تستوسترون در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتا سیتو سترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها (a < b < c) نشاندهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین ستون‌ها است (P<۰/۰۵).



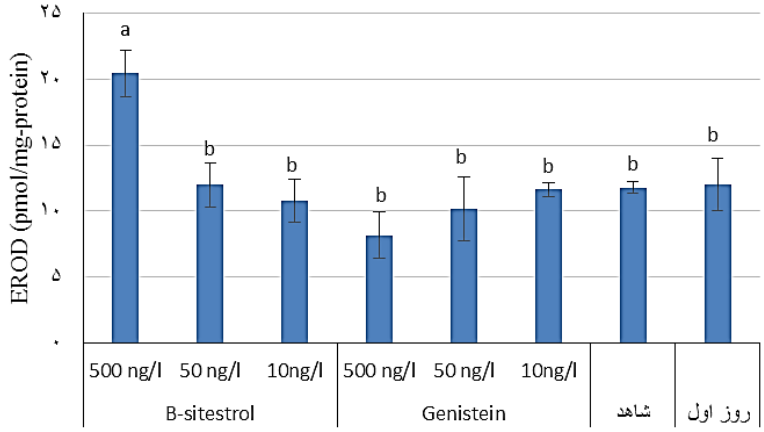
نمودار ۳ - تغییرات میزان کلسیم در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتا سیتو سترول در روز اول و ۲۱ پس از آزمایش. عدم وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها (a < b < c) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین ستون‌ها است (P<۰/۰۵).

نخست آزمایش، به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد جنیستئین سبب افزایش فعالیت آروماتازی گردیده است. این افزایش در مولدین در معرض جنیستئین در مقایسه با فعالیت آروماتازی سنجش شده در روز نخست بیشتر بود.

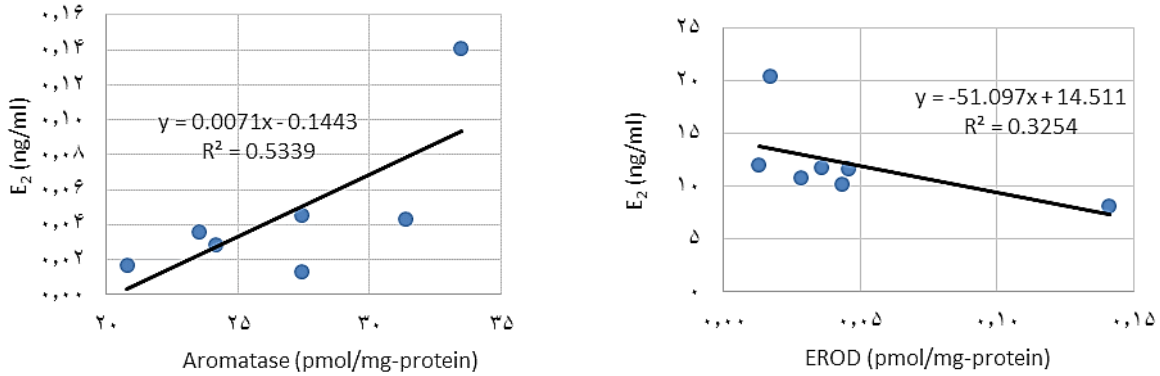
تغییرات فعالیت EROD در مولدین در معرض



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<۰/۰۵).



نمودار ۵ - تغییرات میزان فعالیت EROD کبد در سرم خون مولدین در معرض غلظت‌های مختلف جنیستئین و بتا سیتو سترول 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<۰/۰۵).



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

جنستین و بتاسیتوسترول روند مشابه‌ای نشان نداد. میزان فعالیت پارامتر مذکور اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). به‌شکلی که با افزایش غلظت بتاسیتوسترول میزان فعالیت EROD افزایش یافته در حالی‌که در مولدین در معرض جنیستئین با افزایش غلظت، از فعالیت EROD کاسته شد. هرچند

که بین تیمارهای مختلف جنیستئین 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 جنیستئین 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، به‌طوری‌که 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 می کنند (Whitten and Patisaul, 2001). جنیستئین 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. به‌شکلی که با افزایش میزان غلظت جنیستئین 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 سازسیتوکروم P450 آروماتازاست (Afonso *et al.*, 2001). تولید E_2 تخمدانی در طی زرده‌سازی مطابق با بیان و فعالیت CYP19 افزایش می‌یابد. این امر در گلدفیش، قزل آلا، مداکا، تیلاپیا و بریم گزارش شده است (Brueggemeier *et al.*, 2005).از این‌رو افزایش فعالیت آروماتازی و غلظت بالای استرادیول و مقادیر کم تستوسترون در مولدین در معرض جنیستئین می‌تواند احتمالاً به دلیل افزایش بیان آروماتاز و شروع فعالیت آن باشد (Brueggemeier *et al.*, 2005). افزایش هورمون استرادیول در تیمار ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر جنیستئین، احتمالاً در تمایل بیشتر این ترکیب در اتصال به گیرنده‌های استروژنی (ER_s) 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 جنیستئین و بتاسیتوسترول 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). افزایش غلظت تستوسترون در ماهیان در معرض بتاسیتوسترول در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Orrego*et al.*, 2010a: Maclatchy *et al.*, 1995: Sharpe *et al.*, 2006). همچنین مشخص شده که بتاسیتوسترول با کاهش غلظت کلسترول پلاسما، منجر به کاهش هورمون‌های استرویئدی 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 استرویئدی جنسی تستوسترون و استرادیول و سطح آنها در پلاسما می‌تواند تحت تاثیر فیتواستروژن‌ها قرار گیرند (Stevenson *et al.*, 2011). در گلدفیش تغذیه شده با جنیستئین 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 می یابد (Hosseinzadeh

et al., 2013). بالا بودن میزان کلسیم در همه تیمارها نسبت به شاهد، علی رغم معنی‌دار نبودن، می‌تواند بیانگر شکل‌گیری ویتلین باشد. چرا که نقش هر دو ترکیب در القاء ویتلوژنزیز در بسیاری از مطالعات و گونه‌های که در معرض جنیستئین و بتاسیتوسترول و یا ترکیبات فیتواستروژنی قرارگرفته‌اند 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 پلاسما 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 یافته ها ظرفیت بالقوه جنیستئین را در کنار سایر فیتواستروژن‌ها در بیوسنتز استروئیدی و تاثیر این ترکیبات بر توسعه و عملکرد سیستم تولیدمثلی و غدد درون ریز را نشان می‌دهد (Cederroth *et al.*, 2012).

اثرات فیتواستروژن‌ها بر کبد شامل القاء ویتلوژنین در ماهی ماده و تغییر در فعالیت EROD می‌باشد. فعالیت EROD به‌عنوان یک بیوماکر خوب در خصوص آلاینده‌ها، بویژه آلاینده‌های آلی مطرح شده‌است (Whyte *et al.*, 2000). بتاسیتوسترول از ترکیبات آلی رایج در ترکیبات پساب خروجی کارخانه چوب کاغذ بوده، که به‌عنوان یک ماده آلاینده به شمار 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 مشابه‌ای نیز در این تحقیق مشاهده شد.

طبق یافته‌های این تحقیق، جنیستئین در غلظت‌های کم (۵۰۰ نانوگرم بر لیتر) می‌تواند به‌عنوان محرک سیستم غدد درون‌ریز عمل نماید و سبب تغییر در سطح هورمون‌های استرویئدی 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 به نظر 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 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. J*ournal 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. Xenoestrogen 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 17β-Estradiol levels in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Journal of Aqua Res Development* 4, 159.

Jafari, M., Kamarudin, M.S., Saad, CH.R, Arshad, A., Oryan, SH., Bahmani, M., 2009. Development of morphology in hatchery-reared *Rutilus frissi kutum* Larvae. European *Journal of Science Research* 38(2), 296-305.

Karimzadeh, K., Mostafaee, 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 phyto-estrogens on sex reversal of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)* larvae fed diets treated with 17α-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., Vandenbyl-laardt, 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., MacLatchy, 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 serotogenic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Neuroendocrinology* 49, 894-898.