

بررسی اثرات فیتو استروژن جنیستئین (Genistein) بر بافت تخمدان ماهی نابالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

مرضیه سپهر^{۱*}، شهربانو عریان^۲، طاهره ناجی^۳، پریچهر یغمایی^۴

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: marziye.sepehr@gamil.com

۲- استاد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: sh_oryan@yahoo.com

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: naji.t@iaups.ir

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۶

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس شناسی ۱۳۹۴، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس شناسی است.

چکیده

این مقاله به بررسی تاثیر جنیستئین بر ساختار بافتی تخمدان ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) پرداخته است. شش گروه از ماهی‌های نابالغ به صورت تزریق داخل عضلانی در معرض جنیستئین با دوزهای ۰/۱۵ mg/kg، ۱/۵ mg/kg و ۱۷ mg/kg-17β استرادیول قرار گرفتند. در این راستا گروه شم اتانول دریافت نموده و تیماری روی گروه کنترل صورت نگرفت. سپس برش تخمدان تهیه و از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. آزمون مقایسه دو به دو بر اساس آزمون Tukey، بین میانگین قطر اووسیت در تیمار مربوط به جنیستئین با دوز ۰/۱۵ mg/kg و E2 با دوز mg/kg ۰/۱۵ با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). بر اساس آزمون Mann-Whitney، شمارش اووسیت‌ها در مراحل رشد و نمو در تیمار با جنیستئین ۰/۱۵ mg/kg و ۱۷ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). جنیستئین در دوز ۰/۱۵ دارای اثر استروژنی بود و باعث افزایش رشد و نمو اووسیت‌ها در تخمدان شد. در حالی‌که جنیستئین با دوز ۱۷ mg/kg خواص آنتی‌استروژنی از خود نشان داد. 17β- استرادیول در دوز ۱۷ mg/kg باعث کاهش و در دوز ۰/۱۵ باعث افزایش رشد و نمو در اووسیت‌ها شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، جنیستئین دارای اثر دوگانه استروژنی و آنتی‌استروژنی است. همچنین استروژن E2 در دوزهای بالا رشد و نمو اووسیت را به تاخیر می‌اندازد.

کلمات کلیدی: گورامی سه خال، جنیستئین، فیتواستروژن، تخمدان، بافت‌شناسی.

۱. مقدمه

(آخوندیان و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین بررسی‌های بافت‌شناسی در اغلب موارد به طور مستقیم و یا غیرمستقیم سهم قابل توجهی در کسب اطلاعات زیست‌شناسی تولید مثل ماهیان دارد. در این میان یکی از مهمترین حوزه‌های علم بافت‌شناسی در ارتباط با

مطالعه فرآیند تولید مثل می‌تواند امکان بهره‌برداری از الگوهای طبیعی در تکثیر و پرورش آبزیان را ایجاد نماید

گونه‌های استخوانی قزل‌آلای رنگین‌کمان، نشان دادند که جنیستئینی که در غذای ماهی گنجانده شده می‌تواند رشد و نمو بیضه‌ای را در نرها شتاب داده و تخم‌ریزی را در ماده‌ها به تاخیر اندازد. Zhang و همکاران (۲۰۰۲) پاسخ استروژنیک داده شده به جنیستئین را در ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) مورد بررسی قرار دادند. Ng و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که جنیستئین و سایر ایزوفلاوون‌های موجود در دانه سویا متابولیسم استروژن را در ماهی سالمون مهار می‌کند.

در پژوهش حاضر ماهی گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*) به عنوان یک مدل اندوکروینی در نظر گرفته شد. گورامی‌ها انواع مختلف دارند و تعدادی از آن‌ها در ایران تکثیر و پرورش می‌یابند. این ماهی متعلق به رده ماهی‌های استخوانی^۲ است. گورامی سه‌خال به طور طبیعی در جنوب ویتنام و جزایر سوای^۳ تایلند یافت می‌شود (Herder et al., 2012).

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر جنیستئین به عنوان یک فیتواستروژن روی بافت تخمدان ماهی گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*) است. همچنین از دیگر اهداف خاص این تحقیق بررسی اثرات استروژنی و یا آنتی استروژنی جنیستئین روی ماهی ماده است. مشخص کردن دوز موثر جنیستئین یا به عبارتی میزان اثر این فیتواستروژن در مقایسه با استروژن‌های درون‌زا را نیز می‌توان یکی از مهمترین اهداف کاربردی این مطالعه دانست.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ آماده‌سازی داروها

استوک ۵ میلی‌گرمی جنیستئین سنتز شده با درجه خلوص ۹۸ درصد و کد تجاری G6649 از شرکت سیگماآلدريج آمریکا از طریق شرکت همهران سفینه دانش تهیه شد. دوز تزریقی برای گروه‌های مختلف ماهی‌ها با در نظر گرفتن میانگین وزنی ($\pm SE$) $3/3 \pm 0/4$ گرم، محاسبه گردید. جنیستئین در اتانول ۸۰ درصد در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حل شده و در سه دوز ۰/۱۵، ۱/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم تهیه گردید. ۱۷ بتاسترادیول نیز ساخت شرکت سینوفارم

مکانیسم تولید مثل آبزیان، مطالعات میکروسکوپی بافت‌شناسی گناد است (آژ و همکاران، ۱۳۹۳).

سنتز و ترشح هورمون‌ها جهت تنظیم مجموعه‌ای از فرآیندهای زیست‌شناختی برعهده سیستم اندوکروین در ماهی است. اگرچه برخی تفاوت‌های معنی‌دار در سیستم اندوکروینی ماهی‌ها در مقایسه با پستانداران وجود دارد، اما اساس زیربنایی سیستم اندوکروینی آن‌ها بسیار مشابه پستانداران است (Takatsuki and Yamaguchi, 2001). از این‌رو استفاده از آن‌ها به عنوان مدل‌های آزمایشی در مطالعه موضوعات اندوکروینی کاربردهای زیادی دارد.

مواد شیمیایی مختل‌کننده اندوکروین (EDC)^۱ این قابلیت را دارند که با سیستم اندوکروین مهره‌داران تداخل پیدا کنند. این مولکول‌ها توانایی تنظیم یا قطع سنتز، ترشح، انتقال، اتصال و حذف هورمون‌های درون‌زا در بدن را دارند و به تبع آن بر رفتار بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله انسان اثر می‌گذارند (Sassi-Messai et al., 2009). مواد شیمیایی که مختل‌کننده‌های بالقوه اندوکروین در پستانداران شامل انسان‌ها مورد توجه قرار گیرند (Takatsuki and Yamaguchi, 2001). یکی از بیشترین مسیرهایی که مورد مطالعه قرار گرفته و می‌تواند توسط ترکیبات EDC تحت تاثیر قرار گیرد، محور هورمونی هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد است (Millar and King, 1987) و جنیستئین به عنوان یک EDC می‌تواند این محور را تحت تاثیر قرار دهد. جنیستئین از فیتواستروژن‌های اصلی موجود در رژیم غذایی است و یک ترکیب خوراکی ایجادکننده تغییرات هورمونی و متابولیکی و همچنین فعال‌ترین ایزوفلاوون از نظر زیست‌شناختی است (Szkudelska and Nogowski, 2007). جنیستئین بسته به حالات هورمونی انسان و حیوان می‌تواند اثرات استروژنی و آنتی استروژنی داشته باشد (بابایی و آذرمی، ۱۳۸۴).

جنیستئین اولین بار به عنوان عاملی برای نازایی در گوسفندانی که با علوفه شبدر تغذیه شده بودند گزارش شد (Bennetts et al., 1946). Catherin و همکاران (۲۰۰۱) تاثیرات حاصل از رژیم غذایی غنی شده به وسیله جنیستئین را بر فرآیندهای اندوکروینی گامت‌زایی و کارآمدی تولید مثل ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. آن‌ها به مدت یک‌سال با در معرض قرار دادن

² Osteichthyes

³ Suda

¹ Endocrine disrupting chemicals

پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. سپس بلوک‌ها توسط دستگاه میکروتوم به قطر ۵ میکرون برش‌گیری شدند. نمونه‌های به-دست آمده روی لام قرار داده شدند و پس از آن به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پس از آماده‌سازی لام‌ها و عکس‌برداری جهت بررسی میزان رشد اووسیت‌ها در هر یک از تیمارها ابتدا توسط نرم‌افزار AxioVision محصول شرکت کالرزایس آلمان قطر اووسیت‌ها اندازه‌گیری و سپس مراحل رشد آن‌ها شناسایی گردید. ۷ مرحله از رشد اووسیت در فرآیند قبل از تخمک‌گذاری بر اساس روش ارائه شده توسط Degani تعیین شد (Degani et al., 1994) (جدول ۱). همچنین اووسیت‌هایی موسوم به اووسیت آترتیک^۲ نیز در بافت‌ها شناسایی گردیدند. اووسیت‌های آترتیک به راحتی در بافت رنگ شده با مشاهده جدا شدن غشاء اووسیت از اووپلاسم یا اووپلاسم از هسته قابل شناسایی هستند (Guraya, 1986). در نهایت اووسیت‌ها در هر یک از مراحل رشد خود و برای هر تیمار شمارش شدند.

۴-۲ آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌های شاخص GSI و قطر اووسیت به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام گرفت و درحالت معنی‌دار بودن از آزمون Tukey جهت مقایسه دویه‌دوی نمونه‌ها استفاده گردید. آنالیز آماری داده‌های شمارش اووسیت در مراحل مختلف رشد با استفاده از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis و در صورت معنی‌دار بودن برای مقایسه میانه گروه‌ها به صورت دو به دو از آزمون Mann-Whitney استفاده گردید.

۳. نتایج

نتایج اثرات فیتواستروژن جنیستین در مقایسه با استروژن درون‌زای 17β -استرادیول (E2) روی رشد تخمدان ماهی گورامی سه‌خال از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آن شامل بررسی کیفی مقاطع بافتی در تمام تیمارها به ترتیب در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ آمده است.

آلمان در اتانول ۸۰ درصد حل شد و همانند جنیستین در سه دوز ۰/۱۵، ۱/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم تهیه گردید.

۲-۲ تهیه، نگهداری و تیمار ماهی‌ها

این تحقیق روی ماهیان ماده گورامی سه‌خال نابالغ در سال ۱۳۸۹ انجام شد. تعداد ۸۰ قطعه ماهی ۹۰ روزه از کارگاه تکثیر و پرورش شیلات گستر سبز واقع در استان گیلان مورد مطالعه قرار گرفت. جهت کلرزدایی و بالا رفتن اکسیژن آب ۲۴ ساعت مهلت داده شد و سپس ماهی‌ها وارد آکواریوم‌ها شدند. ماهی‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، pH= ۷/۵، درجه سختی ۳۱۸ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم قرار داده شدند و سه روز به آن‌ها مهلت داده شد تا با محیط سازگار شوند. ماهی‌ها در طول آزمایش به صورت روزانه از غذای استاندارد ماهی گورامی تغذیه شدند. قبل و بعد از تزریق دارو وزن و طول ماهی‌ها اندازه‌گیری شد و تغییرات آن ثبت گردید. آزمایش روی هشت تیمار ده‌تایی در هشت آکواریوم انجام شد. تیمارها شامل گروه کنترل، گروه شم^۱ (اتانول ۸۰ درصد)، گروه‌های تجربی ۱ تا ۶ به ترتیب با دوزهای (جنیستین ۰/۱۵ mg/kg)، (جنیستین ۱/۵ mg/kg)، (جنیستین ۱۷بتاسترادیول ۱۷ mg/kg)، (۱۷بتاسترادیول ۱/۵ mg/kg) و (۱۷بتاسترادیول ۰/۱۵ mg/kg) جهت مطالعه و بررسی استفاده گردیدند. جهت تزریق دارو ابتدا ماهی توسط ماده بیهوشی PI222 (تولید شرکت پارس ایمن دارو) بیهوش گردید. تزریق به روش درون عضلانی انجام شد. مقدار تزریق برای هر ماهی ۲۰ میکرولیتر و به مدت ۱۰ روز در ۵ نوبت هر ۴۸ ساعت یکبار در نظر گرفته شد. پس از پایان دوره تزریق به مدت ۱۰ روز هیچ تیماری روی ماهی‌ها صورت نگرفت و بعد از آن تشریح ماهی‌ها آغاز شد. سپس از هر تیمار تعدادی تخمدان به عنوان نمونه در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از آن مراحل تهیه مقاطع بافتی آغاز گردید.

۳-۲ بافت‌شناسی

پس از طی مرحله تثبیت و پاساژ بافت که شامل آگیری با الکل، شفاف کردن و آغشتگی با پارافین است، نمونه‌ها توسط

^۱ گروهی که فقط ماده حلال را دریافت می‌کند.

^۲ Atretic follicles

۳-۱ بررسی کیفی مقاطع بافتی

با توجه به این شکل، بیشترین قطر اووسیت مربوط به گروه تجربی ۴ یعنی E2 با دوز ۰/۱۵ mg/kg برابر با ۴۶۴ میکرومتر و پس از آن مربوط به گروه تجربی ۱ یعنی جنیستین با دوز ۰/۱۵ mg/kg برابر با ۴۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری گردید. آنالیز واریانس یک‌طرفه ($P < 0/05$) اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد. آزمون مقایسه دوه‌به‌دو بر اساس آزمون Tukey بین میانگین قطر اووسیت در تیمار مربوط به جنیستین با دوز ۰/۱۵ mg/kg با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$). همچنین بین میانگین قطر اووسیت در تیمار مربوط به E2 با دوز ۰/۱۵ mg/kg با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید.

۳-۳ آزمون آماری مراحل رشد اووسیت

نتایج مربوط به شناسایی مراحل رشد اووسیت در مقاطع بافتی تخمدان ماهی گورامی سه‌خال مربوط به تیمار با جنیستین با دوز ۰/۱۵ mg/kg، ۱/۵ mg/kg، ۱۵ mg/kg و همچنین تیمار با E2 ۰/۱۵ mg/kg، ۱/۵ mg/kg، ۱۵ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل و شم در شکل ۳ ارائه شده است. همان‌طور که اشاره شد ۷ مرحله از مراحل رشد اووسیت به همراه اووسیت‌های آترتیک مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۱). تعداد اووسیت‌ها در مراحل مختلف با استفاده از نرم‌افزار ImageJ در هر اسلاید و به صورت تصادفی شمارش گردید (جدول ۲).

در بررسی کیفی مقاطع بافتی تخمدان ماهی گورامی سه‌خال در تیمارهای مختلف، گروه‌های کنترل و شم (Sham group) شامل بافت همبند استروما و سلول‌های جنسی هستند (شکل ۱). این بررسی با توجه به روش ارایه شده توسط Degani (1994) انجام گرفت (جدول ۱). در گروه کنترل، ۳ مرحله هستک کروماتینی، هستک کناری و کورتیکال آلوتولی (حفره‌های قشری) مشاهده گردید (شکل ۱ الف). در تیمار جنیستین با دوز ۰/۱۵ mg/kg و E2 با دوز ۰/۱۵ mg/kg بیشتر اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنیز قرار داشتند (شکل ۱ ج، و). در تیمار با جنیستین دوزهای ۱/۵ mg/kg و ۱۵ mg/kg بیشتر اووسیت‌ها در ۳ مرحله اول رشد دیده شدند و در مقایسه با گروه کنترل اووسیت‌های آترتیک نیز مشاهده گردیدند (شکل ۱ د، ه). در تیمار با E2 با دوز ۱/۵ mg/kg و ۱۵ mg/kg اووسیت‌های آترتیک بیش از سایر سلول‌ها دیده شدند (شکل ۱ ز، ح). شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری نشان‌دهنده بلوغ اووسیت و گذر از مرحله ویتلوژنیز است. این حالت در هیچ‌یک از تیمارها به غیر از E2 با دوز ۰/۱۵ mg/kg مشاهده نگردید.

۳-۲ تعیین قطر اووسیت

میانگین قطر اووسیت، بزرگترین و کوچکترین اووسیت در مقاطع بافتی مربوط به هر یک از تیمارها در شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: مراحل رشد اووسیت

مرحله	درجه رسیدگی	قطر اووسیت	شرح
I	هستک کروماتینی ^۱	۵۵-۸۹ μm	اووسیت دارای یک هسته بزرگ در ناحیه مرکزی، با اووپلاسم به نسبت کوچک است. هستک کوچک‌تر در هسته مشاهده می‌شود. و توزیع کروماتین یکنواخت است.
II	هستک کناری ^۲	۹۰-۱۴۵ μm	ناحیه پلاسم و تناسب اووپلاسم در نواحی هسته‌ای افزایش یافته است. غشاء هسته در یک طرح کلی نامنظم شرکت می‌کند، در حالی که در همین زمان چند هستک در مجاورت دیواره داخلی غشاء هسته قرار می‌گیرند.
III	کورتیکال آلوتولی ^۳ (واکول‌های قشری)	۱۴۵-۳۷۰ μm	واکول‌های قشری در پیرامون فولیکول مشاهده می‌شود. چند هستک کوچک که حول محیط هسته توزیع یافته‌اند، می‌توانند مشاهده شوند. لایه محیطی بعداً متمایز می‌شود.
IV	ویتلوژنیز ^۴	۳۷۰-۶۰۰ μm	گرانول‌های زرده ^۵ ته نشین شده و آلوتولی (واکول‌ها) توسعه می‌یابد تا جایی که تمام اووسیت را پر می‌کند.
V	بلوغ ^۶	۵۰۷-۶۵۰ μm	شکسته شدن وزیکول زایا ^۷ و ناپدید شدن هسته
VI	تخمک رسیده ^۸	۵۷۵-۶۹۰ μm	گرانول‌های زرده تا منطقه محیطی نازک اووسیت، جایگزین کورتیکال آلوتولی (حفره‌های قشری) و اووپلاسم شده‌اند. یک Zonaradiata نازک و یک لایه فولیکول در این مرحله قابل مشاهده است.

¹ Chromatin nucleolar

² Peri-nucleolar

³ Cortical alveoli

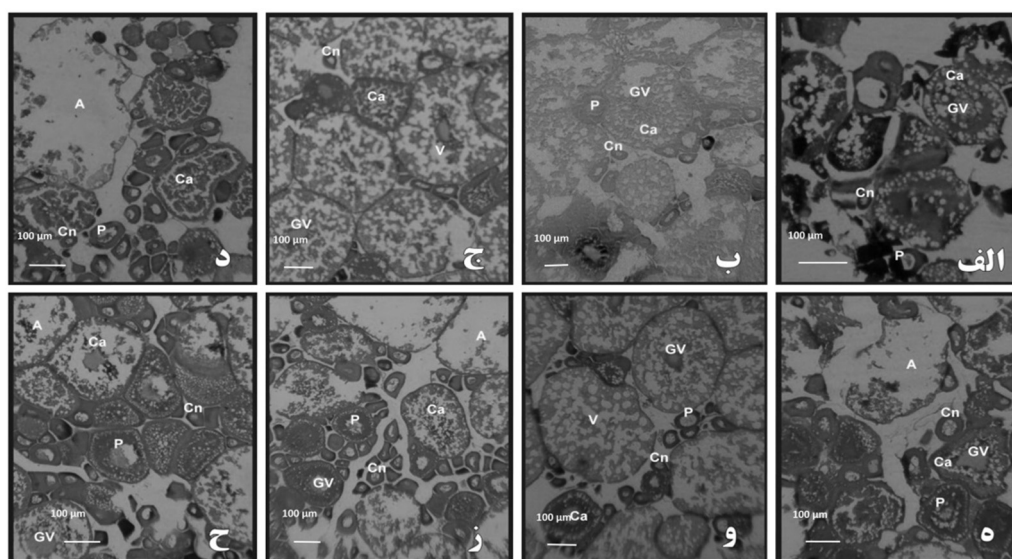
⁴ Vitellogenesis

⁵ Yolk granules

⁶ Maturation

⁷ Germinal vesicle

⁸ Ripe egg

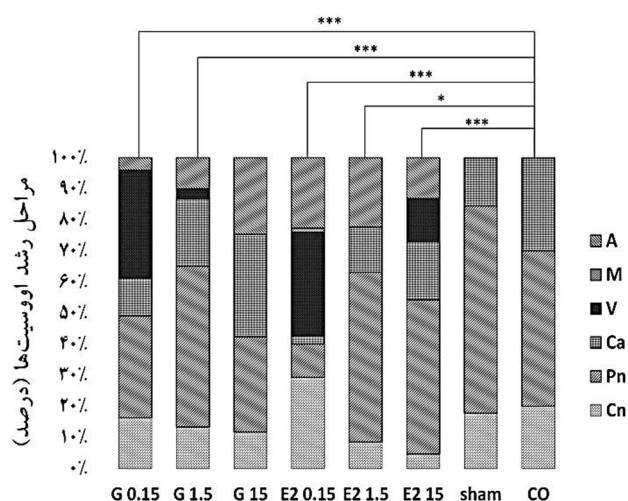


شکل ۱: مقاطعی از بافت تخمدان ماهی گورامی سه خال (H&E, X400)، الف: گروه کنترل، ب: گروه شم، ج: تیمار با جنیستین ۰/۱۵ mg/kg، د: تیمار با جنیستین ۱۵ mg/kg، ه: تیمار با جنیستین ۱۵ mg/kg، و: تیمار با ۰/۱۵ E2 mg/kg، ز: تیمار با ۱/۵ E2 mg/kg، ح: تیمار با ۱۵ E2 mg/kg - Cn: هستک کروماتینی، P: هستک کناری، Ca: کورتیکال آلوتولی، V: ویلوزنزیس، A: اووسیت آترتیک، GV: وزیکول زایا.

آنالیز واریانس یک‌طرفه در حالت پارامتری است مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمون اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد. در مرحله بعد برای مقایسه میانه گروه‌ها به صورت دو به دو از آزمون Mann-Whitney استفاده گردید. نتایج این آزمون نشان داد که در غالب موارد، بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. شکل ۳ درصد اووسیت‌ها را در مراحل مختلف هر تیمار و همچنین نتایج آزمون آماری را نشان می‌دهد.

جدول ۲: شمارش تعداد اووسیت در مراحل مختلف رشد در تیمارها

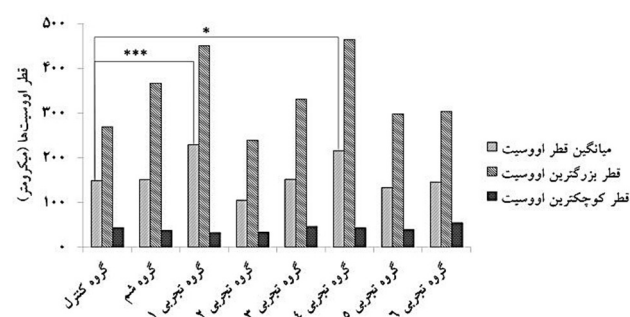
تیمار	هستک کروماتینی	Cn	هستک کناری	Pn	واکول‌های قشیری	Ca	ویلوزنزیس	V	بلوغ	M	آترتیک	A
G 0/15	۲۴	۴۸	۱۸	۵۱	۰	۶						
G 1/5	۸	۳۱	۱۳	۲	۰	۶						
G 15	۱۰	۲۶	۲۸	۰	۰	۲۱						
E2 0/15	۲۲	۸	۲	۲۵	۱	۱۷						
E2 1/5	۱۱	۷۱	۱۹	۰	۰	۲۹						
E2 15	۶	۶۴	۲۴	۱۸	۰	۱۷						
Sham	۸	۳۰	۷	۰	۰	۰						
CO	۱۰	۲۵	۱۵	۰	۰	۰						



شکل ۳: درصد اووسیت‌ها در مراحل مختلف رشد در تیمارها

* اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون Mann-Whitney: $P < 0/05$

*** اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون Mann-Whitney: $P < 0/001$



شکل ۲: میانگین، بزرگترین و کوچکترین قطر اووسیت در گروه‌های تجربی

* اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey: $P < 0/05$

*** اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey: $P < 0/001$

با توجه به اینکه داده‌ها از جنس شمارشی بود، داده‌ها توسط آزمون ناپارامتری Kruskal Wallis که معادل آزمون

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج برخی مطالعات نشان داده است که جنیستین رفتار استروژنی از خود نشان می‌دهد (Santell et al., 1997; Levy et al., 1995; Strauss et al., 1998; Casanova et al., 1999) هنگامی که جنیستین به صورت درون صفاقی به مداکای ژاپنی تزریق شد، سطوح E2 پلازما در ماده‌های قرار گرفته در معرض این ماده بالا رفت که این نشان‌دهنده پاسخ استروژنی جنیستین است (Zhang et al., 2002). در حالی که مطالعات دیگر نشان داده‌اند که جنیستین به صورت یک آنتی‌استروژن عمل می‌نماید (Kiparissis et al., 2003; Leopold et al., 1976). گامت‌زایی و کفایت تولید مثل در قزل‌آلای رنگین‌کمان که به مدت یک سال در معرض رژیم غذایی غنی شده از جنیستین قرار گرفته بود، کاهش یافت (Bennetau-Pelissero and Breton, 2001). در تفسیر رفتار جنیستین باید به این نکته اشاره کرد که جنیستین دارای اثری دوگانه است (Green and Kelly, 2009) و اندام هدف بر اساس نسبت جنیستین و E2 این اثر را میانجی‌گری می‌کند (Adlercreutz, 1995). بنابراین وقتی غلظت جنیستین به E2 نسبتاً بالا است، رقابت در اتصال به گیرنده فعالیت استروژنیک را کم می‌کند (Zhang et al., 2002). Duwe و Zava (1997) با مطالعه Invitro سلول‌های MCF-7 مشاهده کردند که غلظت‌های پایین جنیستین (1µM-10µM) اثر استروژنیک دارند، در حالی که غلظت‌های بالاتر (>10µM) اثرات آنتی‌استروژنیک دارند.

Breton و Bennetau-Pelissero (2001) نشان دادند که وقتی سطوح E2 پلازما در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ماده نابالغ پایین بوده، جنیستین به عنوان یک آگونیست استروژن عمل کرده و سطوح ویتلوژنیز پلازما را افزایش داده است. اگرچه در شروع ویتلوژنیز وقتی که سطوح E2 افزایش می‌یابد، جنیستین به عنوان یک آنتاگونیست استروژن عمل کرده و به شدت در فرآیند بلوغ اووسیت تاخیر ایجاد می‌کند.

در مطالعه حاضر با بررسی بافت‌شناسی تخمدان ماهی گورامی مربوط به دو تیمار جنیستین 0/15 و گروه کنترل مشخص گردید که جنیستین در این دوز مشابه یک استروژن رفتار کرده است. نتایج مطالعات آماری نیز بر این مشاهدات صحت گذاشت. تخمدان ماهیانی که در معرض این دوز از جنیستین قرار گرفته بودند، از لحاظ رشد و نمو یک مرحله

از گروه کنترل پیش بودند. مشاهدات نشان داد تعداد زیادی اووسیت در مرحله ویتلوژنیز قرار داشتند، در حالی که این مرحله در گروه کنترل مشاهده نشد و تنها اووسیت‌ها در ۳ مرحله اول رشد خود یعنی هستک کروماتینی، هستک کناری و کورتیکال آلئولار مشاهده شدند.

از مقایسه مقطع بافتی جنیستین دوز 15 mg/kg با گروه کنترل مشخص شد که جنیستین در این دوز دارای یک رفتار آنتی‌استروژنی بوده است. به عبارتی جنیستین نه تنها به رشد اووسیت‌ها کمک نکرده است، بلکه از رشد آن جلوگیری کرده است. Zava و Duwe (1997) دریافتند که اگرچه جنیستین یک آگونیست استروژن است، اما با فرآیندهای دیگری که مستقل از گیرنده استروژن است نیز تداخل دارد. این فرضیه توسط Cassidy (1998) نیز مطرح شده بود. جنیستین پتانسیل تداخل با عملکرد آنزیم‌های کلیدی را که در بیوسنتز متابولیسم‌های استروژن نقش دارند، ایفا می‌نماید. علاوه بر این جنیستین ممکن است بر انتقال آندروژن و استروژن به اندام هدف از طریق تنظیم کردن فعالیت پروتئین‌های متصل‌شونده به استروئیدهای جنسی (SSBP)^۱ تاثیر گذار باشد. در مطالعه Martin و همکاران (1995) روی پروتئین‌های متصل‌شونده به استروئیدهای جنسی انسان، جنیستین اتصال به E2 و تستوسترون را در یک رفتار وابسته به دوز مهار کرد. ممکن است هر کدام از فرآیندهایی که در بالا مورد بحث قرار گرفتند، در تغییر رشد و نمو تخمدان در تیمارهای با جنیستین در گورامی سه‌خال موثر بوده باشند.

برخی مطالعات از آترزی شدن فولیکول‌ها به دلیل قرار دادن ماهی در معرض فیتواستروژن‌ها گزارش داده‌اند. Kiparissis و همکاران (2003) با قرار دادن مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) در معرض جنیستین دریافتند، ایزوفلاوون باعث کاهش تعداد اووسیت‌های بالغ در حفره تخمدانی^۲ شده که این اتفاق به دلیل بالا رفتن نرخ اووسیت‌های آترتیک بوده است (Kiparissis et al., 2003). همچنین Janz و همکاران (1997) با قرار دادن ماهی مکنده سفید^۳ (*Catostomus commersoni*) در معرض فاضلاب حاصل از کارخانه‌های کاغذسازی (که حاوی مقدار زیادی جنیستین است) دریافتند که آترزی در تخمدان این ماهی‌ها افزایش می‌یابد.

¹ Sex steroid binding proteins

² Ovarian cavity

³ White sucker

جنیستین به عنوان یک برهم‌زننده اندوکرینی در بلوغ و سیستم اندوکرین ماهی اختلال ایجاد می‌کند. با مقایسه گروه تجربی ۱ با دریافت دوز ۰/۱۵ mg/kg جنیستین با گروه کنترل، شاید بتوان این نتیجه را گرفت که جنیستین در دوزهای کمتر بیشترین تاثیر را در بلوغ تخمدان خواهد داشت، این در حالی است که گروه تجربی ۳ با دریافت دوز ۱۵ mg/kg اثرات کمتری را نشان می‌دهد. نتایج این آزمایش بر این مورد صحت می‌گذارد که دوز بالای جنیستین از رشد فولیکول‌ها جلوگیری می‌کند.

منابع

آخوندیان، م.؛ سواری، ا.؛ سلامات، ن.؛ موحدی‌نیا، ع.؛ سالاری، م.، ۱۳۹۴. تغییرات سطح پلاسمایی هورمون‌های استروئیدی (۱۷بتا استرادیول، ۱۷ آلفا ۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون و کورتیزول) و الکترولیت‌ها (کلسیم، سدیم و پتاسیم) طی مراحل مختلف چرخه تولیدمثلی ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) در بندر ترکمن (جنوب دریای خزر). نشریه اقیانوس‌شناسی، جلد ۶، شماره ۲۱، صفحات ۱۲۶-۱۱۷.

آز، ز.؛ سوری‌نژاد، ا.؛ کامرانی، ا.؛ قدرتی شجاعی، م.، ۱۳۹۳. روند رسیدگی تخمدان ماهی کفشک تیزدندان (*Psettodes erumei*) در آب‌های ساحلی شمال خلیج فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی، جلد ۵، شماره ۱۹، صفحات ۷۰-۶۱.

بابایی، ح.؛ آذرمی، ی.، ۱۳۸۴. مقایسه اثرات ۱۷-بتا استرادیول و جنیستین بر روی شریان آئورت رت و ورید سافن انسان. نشریه علوم دارویی، دوره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۸۳، صفحات ۱۰۹-۱۰۱.

Adlercreutz, H., 1995. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives*, 103P.

Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B., 2001. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 121: 173-187.

Bennetts, H.W.; Uderwood, E.J.; Shier, F.L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *John Wiley & Sons*, 2-12PP.

در مطالعه حاضر نیز با بررسی بافت تخمدان ماهی گورامی با جنیستین ۱۵ mg/kg و مقایسه با گروه کنترل، تعداد زیادی اووسیت آترتیک مشاهده گردید، این در حالی بود که اووسیت‌ها هنوز به مرحله ویتلوژنیز نرسیده بودند. در تفسیر این پدیده باید به این نکته توجه کرد که آترزی شدن فولیکول‌ها غالباً در مراحل آخر رشد و نمو در تخمدان اتفاق می‌افتد (Tyler and Sumpter, 1996). البته تحریک نرمال فیزیولوژیکی یا استرس-های محیطی ممکن است منجر به آترزی شدن فولیکول‌ها در هر مرحله‌ای از رشد و نمو آن شود (Nagahama, 1983). تغذیه نامناسب، عوامل فیزیکی، جمعیت بیش از حد و محرک‌های تنش‌زا مثل زنبوبوتیک که منجر به کاهش سطح گنادوتروپین می‌شوند، ممکن است به عنوان محرک‌های محیطی تنش‌زا عمل کنند (Papoulias et al., 2000). آترزی شدن فولیکول‌ها به خصوص فولیکول‌های ویتلوژنیک به دلیل قرار گرفتن در معرض تقلیدکننده‌های استروژن همچون جنیستین بالا می‌رود که منجر به تجمع اووسیت‌ها قبل از مرحله ویتلوژنیک می‌گردد که در نتیجه باروری را کاهش می‌دهد (Seki et al., 2002).

اووسیت‌های آترتیک جذب شده، پیش‌ساز بافت استروما در تخمدان می‌گردند (Yamamoto and Yoshioka, 1964). مکانیزمی که باعث آترزی می‌شود هنوز به صورت کامل شناخته شده نیست. اگرچه بعضی یافته‌ها فرضیاتی در مورد این مکانیزم ارائه داده‌اند (Dietrich et al., 2009).

در مطالعه حاضر با بررسی ۳ نوع مقطع بافتی مربوط به سه تیمار 17β-استرادیول (E2) مشخص گردید که با افزایش دوز E2 رشد و نمو اووسیت‌ها کاهش یافته در حالی که تعداد اووسیت‌های آترتیک افزایش یافته بود. مشابه با این نتایج، و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که گور خر ماهی^۱ ۲۱ روزه که در معرض ۲۱۰۰ ng/Lit E2 قرار گرفته بود با تاخیر ۲ هفته‌ای اولین تخم‌ریزی را آغاز کرد. به عبارتی E2 در ماهی نابالغ منجر به یک تاخیر در زمان رسیدن به بلوغ شده است. در مطالعه Kinnberg و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده شد که در تخمدان گویی‌های تیمار شده با E2، اووسیت‌های آترزی شده و در مرحله زرده‌سازی تخلیه شده بودند. مکانیزمی که توسط آن مهار ته‌نشین شدن زرده در اووسیت رخ می‌دهد، ناشناخته است (Kinnberg et al., 2003). بررسی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که

^۱ Zebra fish

- Herder, F.; Schliewen, U.K.; Geiger, M.F.; Hadiaty, R.K.; Gray, S.M.; McKinnon, J.S.; Walter, R.P.; Pfaender, J., 2012. Alien invasion in Wallace's Dreamponds: records of the hybridogenic "flowerhorn" cichlid in Lake Matano, with an annotated checklist of fish species introduced to the Malili Lakes system in Sulawesi. *Aquatic Invasions*, 7: 521-535.
- Janz, D.M.; McMaster, M.E.; Munkittrick, K.R.; Van Der Kraak, G., 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicology and applied pharmacology*, 147: 391-398.
- Kimberg, K.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P., 2003. Effects of octylphenol and 17 β -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134: 45-55.
- Kiparissis, Y.; Balch, G.; Metcalfe, T.; Metcalfe, C., 2003. Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Environmental health perspectives*, 111-1158.
- Leopold, A.S.; Erwin, M.; Oh, J.; Browning, B., 1976. Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science (New York, NY)*, 98P.
- Levy, J.; Faber, K.; Ayyash, L.; Hughes Jr, C., 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats, 60P.
- Martin, M.E.; Haourigui, M.; Pelissero, C.; Benassayag, C.; Nunez, E.A., 1995. Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sciences*, 58: 429-436.
- Millar, R.; King, J., 1987. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone. *International review of cytology*, 106: 149-182.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. *Fish Physiology*, 9: 223-275.
- Brion, F.; Triffault, G.; Palazzi, X.; Forraz, M.; Garric, J.; Migeon, B.; Noury, P.; Porcher, J.; Thybaud, E.; Tyler, C., 2000. Effect of estradiol on vitellogenesis and reproductive parameters in zebrafish (*Danio rerio*). *Third world congress of the society of environmental toxicology and chemistry*, 21-25PP.
- Casanova, M.; You, L.; Gaido, K.W.; Archibeque-Engle, S.; Janszen, D.B.; Heck, H.A., 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Society of Toxicology*, 236P.
- Cassidy, A., 1998. Risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *Hormonally active agents in food* (Eisenbrand G, Daniel H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Kemper FH, et al. eds). Weinheim: Wiley-VCH, 91-117.
- Catherine, B.; Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B., 2001. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 173-187PP.
- Degani, G.; Gal, E.; Vaya, J., 1994. In vitro biosynthesis of steroids in ovary of asynchronic *Trichogaster trichopterus* (Pallus, 1770). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109: 715-723.
- Dietrich, D.; Krieger, H.O.; Rumpf, S., 2009. *Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish*. Wiley-Interscience.
- Green, C.; Kelly, A., 2009. Effects of the estrogen mimic genistein as a dietary component on sex differentiation and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 377-384.
- Guraya, S., 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. *Monographs in developmental biology*, 18, 1.

- 1698.
- Strauss, L.; Makela, S.; Joshi, S.; Huhtaniemi, I.; Santti, R., 1998. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Molecular and cellular endocrinology*, 83-93PP.
- Szkudelska, K.; Nogowski, L., 2007. Genistein-a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 105: 37-45.
- Takatsuki, A.; Yamaguchi, I., 2001. Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds. *Riken Review*, 43-44.
- Tyler, C.; Sumpter, J., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries*, 6: 287-318.
- Yamamoto, K.; Yoshioka, H., 1964. Rhythm of development in the oocyte of the medaka, *Oryzias latipes*. *Bulletin of the faculty of fisheries hokkaido university*, 15: 5-19.
- Zava, D.T.; Duwe, G., 1997. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutrition and Cancer*, 27: 31-40.
- Zhang, L.; Khan, I.A.; Foran, C.M., 2002. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 203-211PP.
- Ng, Y.; Hanson, S.; Malison, J.A.; Wentworth, B.; Barry, T.P., 2006. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture*, 658-665PP.
- Papoulias, D.M.; Noltie, D.B.; Tillitt, D.E., 2000. An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinyl estradiol. *Aquatic Toxicology*, 48: 37-50.
- Pelissero, C.; Bennetau, B.; Babin, P.; Le Menn, F.; Dunogues, J., 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 38: 293-299.
- Santell, R.C.; Chang, Y.C.; Nair, M.G.; Helferich, W.G., 1997. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *Journal of Nutrition*, 263P.
- Sassi-Messai, S.; Gibert, Y.; Bernard, L.; Nishio, S.; Lagneau, K.; Molina, J.; Andersson-Lendahl, M.; Benoit, G.; Balaguer, P.; Laudet, V., 2009. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PloS one*, 4: 4935.
- Seki, M.; Yokota, H.; Matsubara, H.; Tsuruda, Y.; Maeda, M.; Tadokoro, H.; Kobayashi, K., 2002. Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1692-