



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

# مقایسه اثرات فیتواستروژن تخم گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) و ۱۷ بتا استرادیول بر بافت تخمدان و کبد ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال

طاهره ناجی<sup>۱\*</sup>، پریناز شهروزی فر<sup>۱</sup>، همایون حسین زاده<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم پایه، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی تهران، ایران.

دوره پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳

صفحات ۱۳۴-۱۲۵

\* نویسنده مسئول: [naji\\_t@iaups.ac.ir](mailto:naji_t@iaups.ac.ir), [tnaji2002@gmail.com](mailto:tnaji2002@gmail.com)

## چکیده

فیتواستروژن و ۱۷ بتا استرادیول (E2) بر بافت تخمدان و کبد ماهی ماده‌ی گورامی سه خال مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پس از کلرزدایی آب آکواریوم‌ها، ماهیان ماده با میانگین وزنی  $0.5 \pm 1.5$  g در آکواریوم‌ها رهاسازی شده، به منظور آداپته شدن با محیط به مدت یک هفته نگهداری شدند. بعد از اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی اولیه (pH، درجه حرارت، سختی، قلیائیت)، آزمایشات در ده گروه (دو گروه تحت کنترل و هشت گروه تحت تیمار) که هر گروه شامل ده قطعه ماهی ماده است، انجام گرفت. به ماهیان به صورت جداگانه عصاره‌ی تخم شنبلیله و E2 در دوزهای (۱۰-۲۰-۳۰-۵۰ mg/kg) به مدت ۲۰ روز و به صورت یک روز در میان در عضله زیرباله‌ی پشتی به روش (IM) تزریق شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌برداری ماهیان انجام و بافت‌های مورد نظر خارج شد. پس از انجام مراحل پاساژ بافت و رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ، بافت‌های تخمدان و کبد ماهیان مورد بررسی قرار گرفت و با تیمارهای کنترل مقایسه شد. سپس با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS و آزمون‌های آماری ANOVA و DUNCON بافت تخمدان و کبد تیمارهای شاهد با تیمارهای کنترل مقایسه شد. همچنین شاخص‌های گنادوسوماتیک و هیاتوسوماتیک نیز اندازه‌گیری شد. از نظر شاخص‌های HSI، GSI اختلاف معناداری در گروه‌های تیماری با شنبلیله و E2 با گروه کنترل و شاهد، مشاهده شد ( $P < 0.01$ ). بررسی قطر اووسیت‌ها نیز اختلاف معناداری بین گروه‌های تیماری با تخم شنبلیله و E2 در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.01$ ). نتایج نشان داد که با افزایش دوز عصاره گیاه شنبلیله و ۱۷ بتا استرادیول HSI، GSI و قطر اووسیت‌ها افزایش پیدا کرد ولی این افزایش در ۱۷ بتا استرادیول بارزتر بود.

واژه‌های کلیدی: ۱۷ بتا استرادیول، ماهی گورامی سه خال، بافت تخمدان، بافت کبد، عصاره تخم شنبلیله



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 5(1)61-70, 2014

## Comparison between phytoestrogen *Trigonella foenum-gracum* L seed and $17\beta$ estradiol, on ovarian and hepatic tissues of female immature three spot gourami

Naji, T.<sup>\*1</sup>, Shahruzifar, P.<sup>1</sup>, Hosseinzade, H.<sup>2</sup>

1. *Department of Basic Sciences, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

2-*Research Institute of Fisheries Science, Tehran, Iran.*

\* *Corresponding author: naji\_t@iaups.ac.ir, tnaji2002@gmail.com*

### Abstract

Studies shows that Fenugreek is due to estrogenic compounds phytoestrogenic properties. In this study, it is used Fenugreek seed extract as a phytoestrogen and  $17\beta$  estradiol (E2) on ovarian and liver tissues of female spot gourami. For this purpose, the fishes were released to chlorine less aquarium water, their weighted average was between  $1.5 \pm 0.5$  g. They were kept for one week in same condition for adaptation with new condition. These experiments were performed in ten groups (two control groups and eight treated groups); each group contained ten immature of female fishes. For 20 days, Fenugreek extract and E2 (following doses 10,20,30,50 mg/kg) were injected separately under dorsal fin, injection method was IM (Inter muscular). After 24 hours, ovary and liver tissues were taken, after passage of texture and staining, the tissues were examined under microscope and were compared with control treatment. Then using the software programs like SPSS and statistical tests like DUNCON and ANOVA, Ovarian and liver tissue samples were compared with different treatments as well as Gonadosomatic and hepatosomatic indices were measured. Significant differences in treatment of GSI and HSI treated with *Trigonella foenum-gracum* L and E2 was observed in control groups. Results showed that increasing the dose of fenugreek extract and E2 GSI, HSI and diameter of oocytes increased but this increase was more significant in E2.

**Key words:**  $17\beta$  estradiol (E2), three spot gourami, ovary, liver, *Trigonella foenum-gracum*

مقدمه

در سالهای اخیر علاقه به مصرف فیتواستروژن ها یا استروژن های مشتق از گیاهان در انسان به علت بهره مندی از مزایای آن افزایش یافته است (۱). فیتو استروژن ها ترکیباتی گیاهی هستند که به طور ساختاری مشابه با استروژن های حیوانی می باشند (۵، ۱۲). فیتواستروژن ها ترکیبات فعال اندوکرینی هستند که تأثیرات مضر آنها بر روی سیستم های تولید مثلی حیوانات و همچنین تأثیراتی سودمند از آنها بر روی سلامت انسان گزارش شده است این تأثیرات شامل اثرات حفاظتی بر روی سرطان های وابسته به هورمون مثل سرطان سینه، پروستات و کلون، بیماری های قلبی عروقی و همچنین تأثیراتی بر روی پوکی استخوان و علائم یائسگی می باشد (۴، ۱۲، ۱۵ و ۱۵). فیتواستروژن ها به سه گروه لیگنان ها، ایزوفلاون ها و کومستان ها تقسیم می شوند (۱۱). که در غلظت های بالا در گیاهانی همچون خانواده لگومیناسه یافت میشوند (۷). شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) گیاه دارویی از خانواده نخود است. امانی و همکاران در سال ۱۳۹۲، اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن گیاه ختمی و ۱۷ بتا استرادیول را بر رشد و رسیدگی اووسیت ها و بافت کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) را بررسی کردند. نتایج به این صورت بود که با افزایش دوز عصاره گیاه ختمی GSI افزایش پیدا کرد اما در دوز ۵۰ mg/kg عصاره ختمی GSI کاهش چشمگیری پیدا کرد (۲). عصاره و همکاران در سال ۱۳۹۲، اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن گیاه چای سبز و ۱۷ بتا استرادیول را بر رشد و رسیدگی اووسیت ها و بافت کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) را بررسی کردند. نتایج به این صورت بود که با افزایش دوز عصاره گیاه چای سبز GSI افزایش پیدا کرد اما در دوز ۵۰ mg/kg عصاره چای سبز GSI کاهش پیدا کرد (۳). فخری و همکاران در سال ۱۳۹۱، اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن گیاه رازک و ۱۷ بتا استرادیول را بر رشد اووسیت ها و بافت

کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) را بررسی کردند. نتایج به این صورت بود که با افزایش دوز عصاره گیاه رازک GSI و HSI افزایش پیدا کرد (۹).

از آنجا که مواد موجود در گیاه شنبلیله به عنوان جایگزین استروژن های مصنوعی در کنترل محور HPG به کار رفته اند و با توجه به این که تا کنون اثر عصاره الکلی گیاه بر محور HPG (هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد) مورد بررسی قرار نگرفته است و به دلیل تشابه سیستم غدد درون ریز و محور HPG در ماهیان و پستانداران، از ماهی گورامی سه خال به عنوان مدل استفاده شد. لذا در این مطالعه اثرات عصاره گیاه و ۱۷ بتا بر رشد و رسیدگی اووسیت ها در تخمدان و در کبد ماهی گورامی سه خال مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

این تحقیق در شهریور - مهر ماه ۱۳۹۲ در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی انجام پذیرفت. ۱۰۰ قطعه ماهی گورامی سه خال نابالغ با میانگین وزنی ۵/۰ ± ۵/۱ از یکی از کارگاه های پرورش ماهی واقع در چالوس تهیه شد. ۴۸ ساعت قبل از ورود ماهی ها با هدف کلرزدایی، گرم شدن آب و بالا بردن سطح اکسیژن آب، آکواریوم ها از آب پر شدند. برای سازگار شدن ماهی ها، پس از ورود به مدت ۲ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۸-۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و روزی یکبار با غذای استاندارد ماهی تغذیه شدند. نظافت فیلترهای آکواریوم ها یک روز در میان انجام گرفت. ۱۰۰ قطعه ماهی در ۱۰ گروه شامل ۴ گروه تحت تیمار برای عصاره شنبلیله، ۴ گروه تحت تیمار برای E<sub>2</sub> و یک گروه کنترل اتانولی و یک گروه دست نخورده که هر گروه شامل ۱۰ قطعه ماهی نابالغ بودند. ماهی ها به طور کاملاً تصادفی در آکواریوم ها رهاسازی شدند. قبل از آزمایش، در حین و در پایان کار فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب نظیر pH، درجه

یک روز در میان به هر یک از تیمارها انجام گرفت. در پایان آزمایشات به مدت سه روز، هیچ عملی بر روی ماهی‌ها صورت نگرفت سپس با ماده PI<sub>222</sub> که یک عصاره گیاهی است بیهوش شدند. ابتدا بیومتری ماهیان صورت گرفت و سپس اندام های داخلی جدا و تخمدان و کبد ماهیان خارج گردیده و وزن شدند و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. پس از انجام مراحل پاساژ بافت، برش گیری بافت ها به ضخامت ۸-۷ میکرون انجام شد رنگ آمیزی با H&E صورت گرفت. سپس بافت ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند و برای تعیین شاخص رشد گنادی از فرمول  $GSI = WG/W \times 100$  که وزن گناد: WG، وزن کل بدن ماهی: W و شاخص هیپاتوسوماتیک (HSI) از فرمول  $HSI = WH/W \times 100$  که وزن کبد: WH، وزن بدن ماهی: W استفاده گردید.

در مرحله نهایی قطر تخمک ها اندازه گیری شد برای این کار ابتدا از اسلایدهای تهیه شده از تخمدان گروه‌های تجربی عکسبرداری شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار Axiovision قطر تخمک اندازه گیری و در جداول نمونه برداری آورده شد

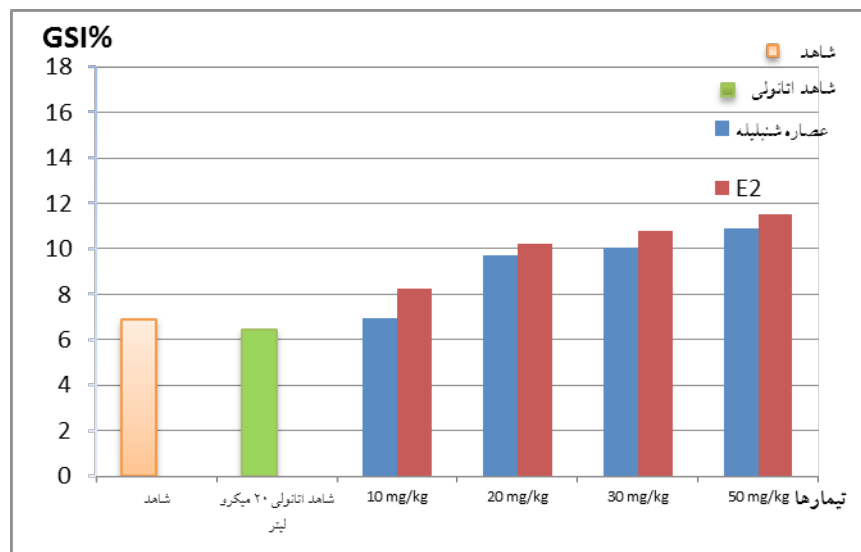
جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نظر شاخص گنادو- سوماتیک (GSI) از نرم‌افزار SPSS و روش آماری آنالیز یک طرفه (one way-ANOVA)، مقایسه‌ی میانگین توسط آزمون دانکن استفاده شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

### نتایج

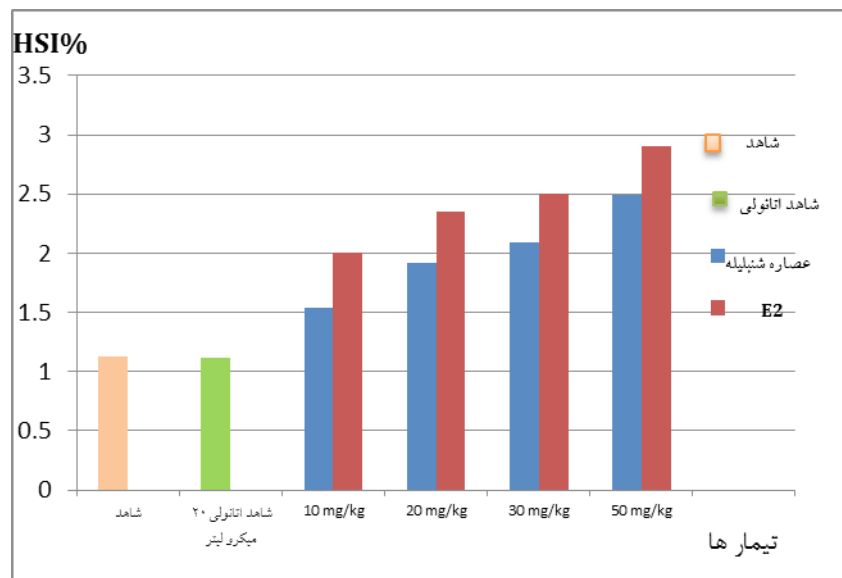
میانگین شاخص رشد گنادی (GSI) و کبدی (HSI) و میانگین قطر تخمک‌ها مطابق نمودارهای ۱، ۲ و ۳ می‌باشند.

حرارت و سختی اندازه‌گیری شدند. بعد از ۱۰ روز از زمان اولین تزریق ماهی‌ها با PI<sub>222</sub> بیهوش شدند سپس وزن و طول ماهیان اندازه‌گیری شد و بافت تخمدان و کبد آنها جدا شد. پس از فیکس کردن بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد، جهت بررسی‌های هیستولوژیکی، پاساژ بافت انجام گرفت سپس بافت‌ها برش‌گیری شده و به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین رنگ شدند و در نهایت به وسیله میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

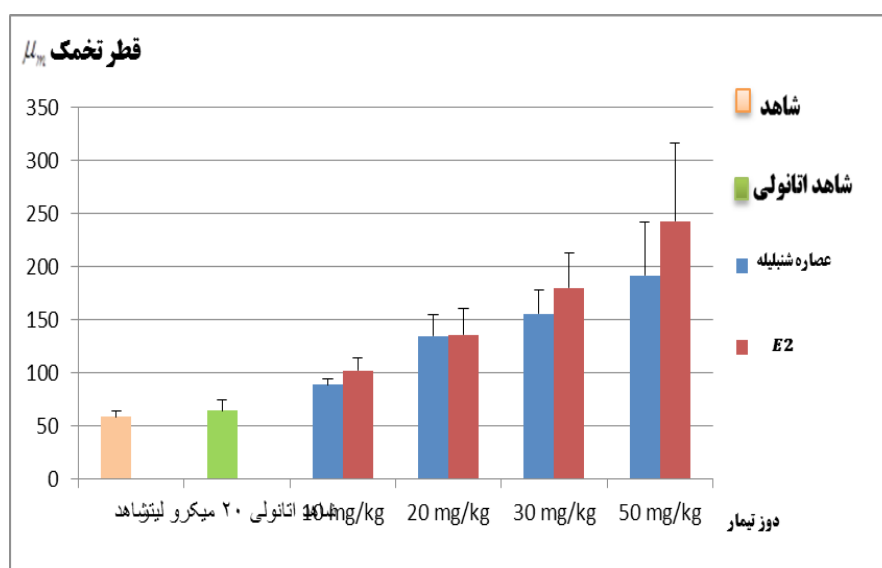
تیمارهای مورد بررسی شامل گروه ۱، شاهد بدون تزریق، گروه ۲، تزریق ۲۰ میکرولیتر اتانول رقیق شده، گروه ۳ تا ۶ بترتیب تزریق ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره شنبلیله و گروه‌های ۷ تا ۱۰ بترتیب تزریق ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم E<sub>2</sub> در ماهی گوامی سه خال بودند. برای استخراج عصاره شنبلیله ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم تخم گیاه به همراه مقدار مناسبی اتانول در دکانتور ریخته شد. عصاره الکلی، به روش خیساندن تهیه شد که حدوداً ۱۰ روز به طول انجامید. هر ۳ روز این کار تکرار شد در روز آخر عصاره‌های جمع‌آوری شده درون دستگاه روتاری قرار گرفتند و بعد از نیم ساعت عصاره‌ی نیمه خشک به دست آمد و بعد از ۲ الی ۳ روز مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا عصاره‌ی خشک شده به مقدار مورد نظر توسط ترازویی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شد سپس در اتانول به عنوان حلال، حل شد و غلظتهای مناسب از آن تهیه شد. همچنین ماده ۱۷ بتا استرادیول والرات با درجه خلوص ۸۰٪، از شرکت داروسازی ابوریحان تهیه و در اتانول به عنوان حلال حل شد و غلظتهای مناسب از آن تهیه شد. برای دریافت دارو ابتدا به وسیله‌ی سرنگ انسولین ۰/۵ میلی‌لیتر نوع BD (ساخت شرکت Bectondickinson آمریکا) به میزان ۲۰ میکرولیتر از هر دارو برداشته شد و پس از قراردادن پنبه‌ی مرطوب روی آبشش ماهی و مهار نمودن سر و دم ماهی، دارو بین باله‌ی پشتی و خط جانبی درون عضله تزریق گردید. تزریقات به مدت ۲۰ روز، به صورت



تصویر ۱- مقایسه شاخص رشد گنادی (GSI%) در تیمارهای مختلف و کنترل در ماهی ماده گورامی نابالغ سه خال

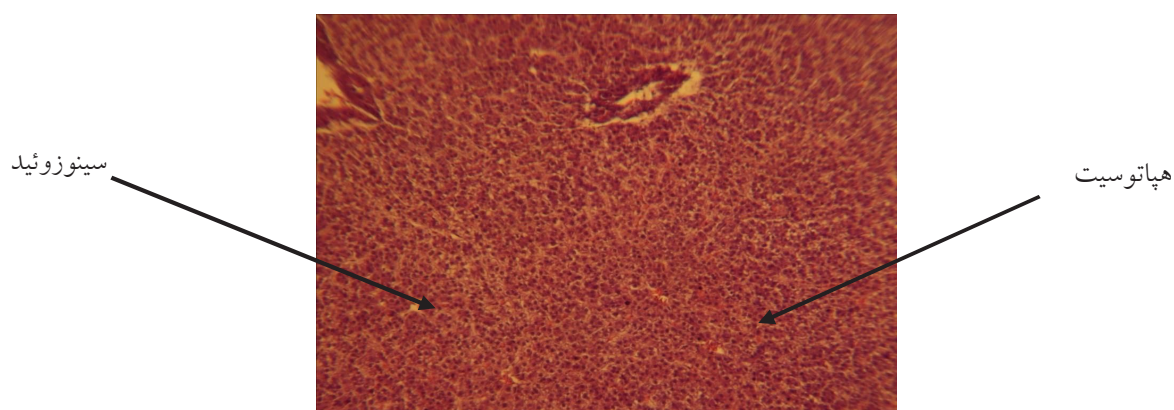


تصویر ۲- مقایسه شاخص رشد کبدی (HSI%) در تیمارهای مختلف و کنترل ها در ماهی ماده گورامی نابالغ سه خال

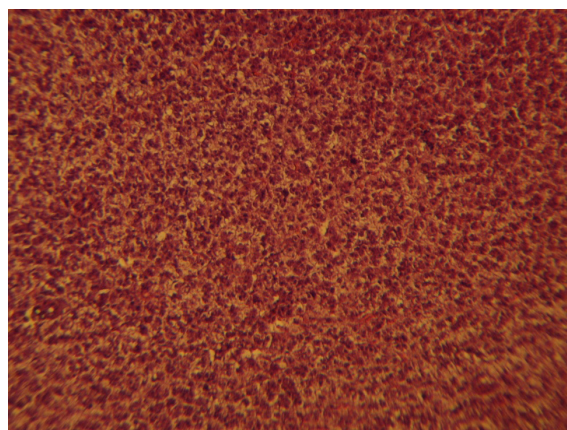


تصویر ۳- مقایسه قطر تخمک‌ها بین تیمارهای عصاره الکلی گیاه شنبلیله و ۱۷ بتا استرادیول و کنترل‌ها

(Mean  $\pm$  SEM)

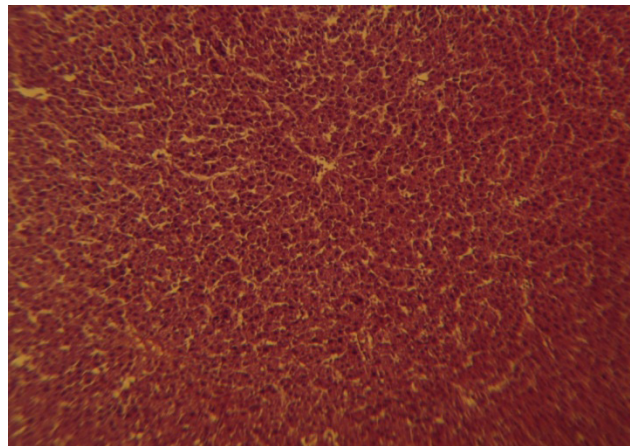


تصویر ۴- مقطعی از بافت کبد تیمار شاهد بدون تزریق (H&E، با بزرگنمایی ۴۰۰ X)



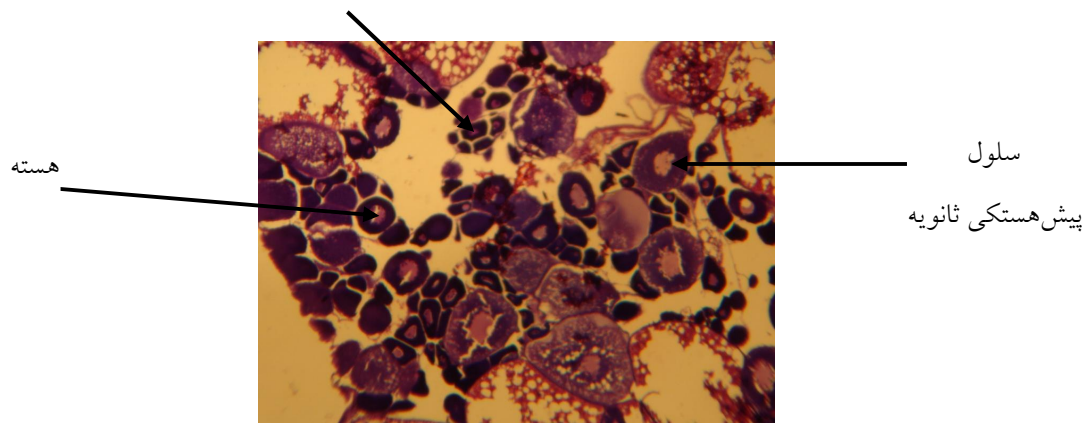
تصویر ۵- مقطعی از بافت کبد تیمار ۵۰ mg/kg شنبلیله با بزرگنمایی (H&E، با بزرگنمایی ۴۰۰ X)



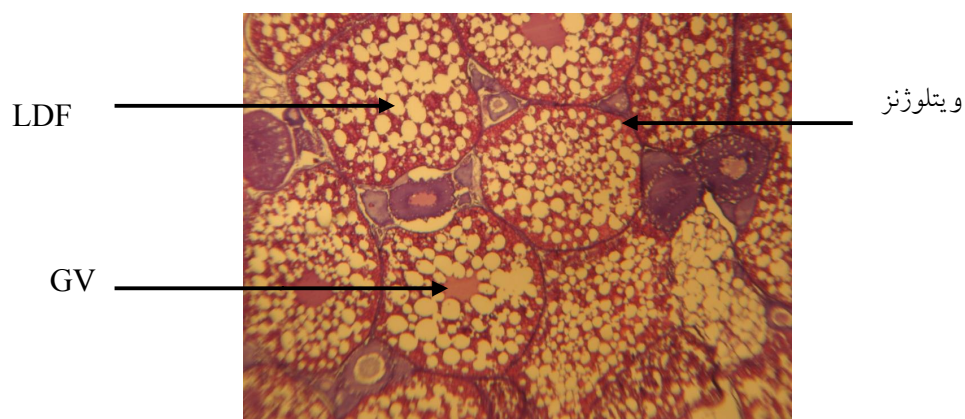


تصویر ۶- مقطعی از بافت کبد ۱۷ بتا استرادیول ۵۰ mg/kg، با بزرگنمایی ۴۰۰ (X)

سلول پیش‌هستکی اولیه

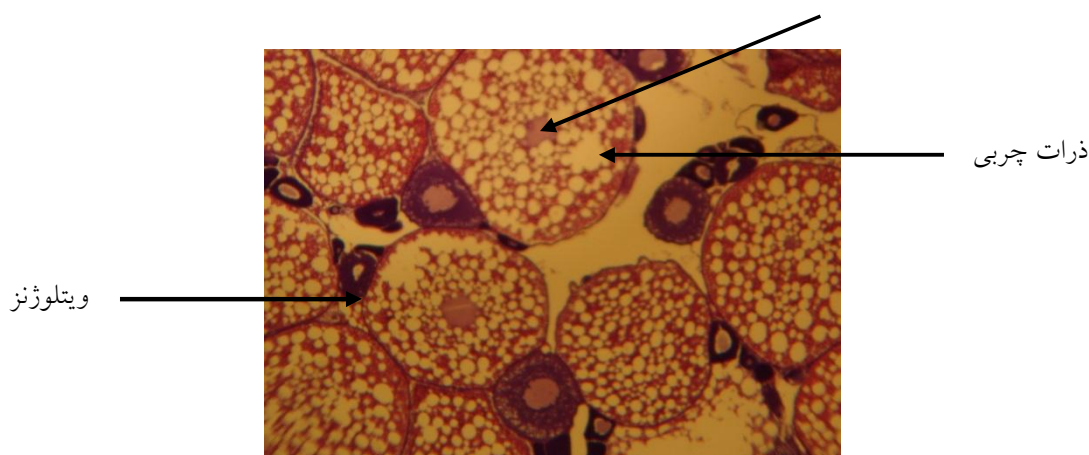


تصویر ۷- مقطعی از بافت تخمدان تیمار شاهد بدون تزریق (بیشتر سلولها در مرحله پیش‌هستکی) (H&E، بزرگنمایی ۴۰۰ X)



تصویر ۸- مقطعی از بافت تخمدان تیمار ۵۰ mg/kg شنبلیله، شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر (LDF)، (H&E، بزرگنمایی ۴۰۰ X)

GV



تصویر ۹- مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار ۱۷ بتا استرادیول  $50 \text{ mg/kg}$ ، مرحله غالب ویتلوژنیزس (V)، شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اوپلاسم (LDF). (H&E، بزرگنمایی  $400 \times$ )

#### بحث و نتیجه گیری

خال (*Trichogaster trichopterus*) با افزایش دوز عصاره گیاه ختمی GSI افزایش پیدا کرد ولی این افزایش در دوز  $50 \text{ mg/kg}$  عصاره ختمی با کاهش چشمگیری GSI مواجه شد (۲). عصاره و همکاران در سال ۱۳۹۲ نیز اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن گیاه چای سبز و ۱۷ بتا استرادیول را بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها و بافت کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) بررسی کردند آنها نیز به نتایج مشابهی رسیدند (۳). نتایج حاصل از بافت‌شناسی کبد در تحقیق حاضر نشان داد، تفاوت محسوسی از نظر هایپرتروفی هپاتوسیت‌ها و افزایش فضای سینوزوئیدی بین تیمار با دوز بالای شنبلیله و ۱۷ بتا استرادیول در مقایسه با گروه شاهد وجود داشت ( $P < 0.01$ ). در کبد ماهی‌هایی که تحت تیمار با  $E_2$  بودند ساخت ویتلوژین القا شد و به تدریج با افزایش دوز استرادیول، سطح هورمون‌های استروژنیک بالا رفته و میزان زرده زایی افزایش یافته است. تیمارهای تحت درمان با  $E_2$  در مقایسه با عصاره شنبلیله تغییر چشم‌گیری مشاهده نشده است ( $P \geq 0.01$ ) (اشکال ۶ و ۷). فخری و همکاران در سال ۱۳۹۱ پژوهش مشابهی بر روی گیاه رازک انجام دادند و نتایج در خصوص GSI و

نتایج حاصل از مقایسه گروه شاهد و کنترل اتانولی از نظر شاخص رشد گنادی هیچ گونه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.01$ ) (تصویر ۱). که این امر نشان‌دهنده بی‌تأثیر بودن حلال به کار رفته در روند تسریع بلوغ نهایی می‌باشد. بررسی نتایج به دست آمده از مقایسه GSI بین تیمارهای مختلف (تصویر ۲) و همچنین تغییرات بافت‌شناسی حاصل از گروه‌های مختلف از نظر فاز تکاملی غالب اووسیت‌ها در هر گروه نشان داد که استفاده از شنبلیله و  $E_2$  می‌تواند سبب تسریع در رشد و رسیدگی اووسیت در ماهی گورامی سه خال شود رشد و رسیدگی از تیمار اول تا چهارم شنبلیله و تیمار پنجم تا هشتم  $E_2$  سیر صعودی داشته است ( $P < 0.01$ ) (اشکال ۷ و ۹). با توجه به تصویر ۱ بیشترین مقدار شاخص گنادوسوماتیک با مقدار  $10/5$  درصد مربوط به دوز  $50 \text{ mg/kg}$  و کمترین مقدار مربوط به دوز  $10 \text{ mg/kg}$  با مقدار  $7$  درصد در عصاره شنبلیله است. امانی و همکاران در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن گیاه ختمی و ۱۷ بتا استرادیول را بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها و بافت کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه



## References

- 1- Adlercreutz, H. (1995) Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. National institute of Environmental Health Science 103 112-117.
- 2-Amani, N., Naji, T., Hosseinzadeh, H. (2013) Investigation of histological effects of phytoestrogen Marshmallow plant extract and 17 beta estradiol, on ovarian and hepatic tissue of female three spot gourami. PhD Thesis. Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University. 75-79(text in Persian).
- 3- Asare, M., Naji, T., Hosseinzadeh, H. (2013) Investigation of histological effects of phytoestrogen Green Tea Extract and 17 beta estradiol, on ovarian and hepatic tissue of female three spot gourami. PhD Thesis. Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University. 75-85(text in Persian).
- 4-Beck, V., Rohr, U., Jungbauer, A. (2005) Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy. Elsevier 94 499-518.
- 5-Clotfelter, E.D., Rodriguez, A.C. (2006) Behavioral changes in fish exposed to Phytoestrogens. Elsevier 144 833-839.
- 6- Degani, G. (1993) The effect of sexual behavior on oocyte development and steroid changes in *Trichogaster trichopterus*. Copeia 4 1091-1096
- 7-Dixon, R.A. (2004) phytoestrogens. Annual Reviews 102-117.
- 8- Donaldson, E.M., Hunter, G.M., Hoar, W.S., Donaldson, E. M. (1983) Induced final maturation,

HSI مشابه این پژوهش بود(۹). میانگین قطر اووسیت‌ها در تیمارهای ۱۷ بتا استرادیول و شنبلیله نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معناداری داشتند که این نشانگر افزایش قطر اووسیت‌ها با تزریق تخم گیاه شنبلیله و ۱۷- بتا استرادیول در ماهی گورامی سه‌خال شده در نتیجه اووسیت‌ها تکامل بیشتری را داشتند(تصویر ۳). Degani و همکارانش در سال ۱۹۹۴ بیان نمودند که استروئیدها باعث رشد فولیکول‌ها و پیشبرد مراحل تخمدانی می‌گردد(۶). همچنین شفیع‌ی ثابت و همکاران در سال ۲۰۱۱ که اظهار داشتند ارتباط مستقیمی بین شاخص رشد اووسیت و تزریق ۱۷ بتا استرادیول در ماهی وجود دارد، که تصدیقی بر مطالعه حاضر می‌باشد(۱۶). Donaldson در سال ۱۹۸۳ نیز در نتایج پژوهش خود دریافت که میزان هورمون تزریقی به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در فرآیند کنترل تمایز جنسی ماهیان محسوب می‌گردد(۸). در تحقیق دیگری که توسط Person و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد مشاهده گردید که رسپتورهای  $E_2$  با مقیاس کم و قدرت بالا در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان وجود دارد و به هر دو هورمون استروژن و  $E_2$  تمایل نشان می‌دهد(۱۴). نتایج بدست آمده تاییدی در این پژوهش مبنی بر تحت تأثیر گرفتن ماهی با تزریق ۱۷- بتا استرادیول می‌باشد. ایمان‌پور و همکارش نیز در سال ۱۳۸۸ مشاهده کردند که افزایش وزن گنادهای ماهی کپور با افزایش مقدار هورمون‌های استروئیدی مرتبط است و این امر را به علت افزایش ویتلوژنین که یک فسفولیپوگلیکوپروتئین است در گنادهای می‌دانند(۱۰). Morehead و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که جایگزینی هورمون‌های فیتواستروژنها در کنترل علائم یائسگی بسیار موثر می‌باشند(۱۳). نتایج نشان داد که با افزایش دوز عصاره گیاه شنبلیله و ۱۷ بتا استرادیول HSI, GSI و قطر اووسیت‌ها افزایش پیدا کرد ولی این افزایش در ۱۷ بتا استرادیول بارزتر بود.

- ovulation, and spermiation. In: editors. Fish physiology. New York: Academic Press. 351-403.
- 9- Fakhri, F., Najj, T., Hosseinzadeh, H. (2012) Investigation of histological effects of phytoestrogen Hops extract and 17 beta estradiol, on ovarian and hepatic tissue of female three spot gourami. PhD Thesis. Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University. 75-85(text in Persian).
- 10-Imanpoor, M.R., Safari, R. (2009) Effect of maturation stages on gonadal indices and Chemical composition of gonad in Cyprinius carpio (Cyprinidae). MSc thesis. Fisheries Department, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Gorgan University. 5-7.
- 11-Korpela, R.(1995) Role of rye fibre and Lactobacillus GG in colonic metabolism. PhD thesis. Kuopio University, Finland.
- 12- Kurzer, M.S., Xu, X.(1997) Dietary Phytoestrogens.Vol.17.Annual Reviews 353-381.
- 13- Morehead, D. T., Pakhurst, N. W., Ritar, A. (1998) Effect of treatment with LHRH analogue on oocyte maturation, plasma sex steroid levels and egg production in female Striped. Lineate atrididae). Aquaculture 169 315-331.
- 14- Persson, I.J., Shrimpton, M., Stephan, D., Bjo “rn Thrandur Bjo” rnsso, (2000) The Presence of High-Affinity, Low-Capacity Estadiol-17b Binding in Rainbow Trout Scale Indicates a Possible Endocrine Route for the Regulation of Scale Resorption, General and Comparative Endocrinology 120 35-43.
- 15-Setchell, K.D.R., Cassidy, A.(1999) Dietary isoflavones:biological effects and relevance to human health.AM Soc Nutrition 129 758.
- 16- Shafeie sabet, S. (2011) Study on level of 17 beta estradiol and testestrone in female kutum reutilus drisii kutum of sothern Caspian sea world. Journal of zoology 6 (3) 220-226.