

بررسی اثر عصاره تخم کدو تنبل (*Cucurbita pepo*) و β 17- استرادیول بر روی محور HPG در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

طاهره ناجی*^۱، همایون حسین زاده صحافی^۲ و سیما امیدی^۳

۱ و ۳- واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۵

چکیده

در این تحقیق اثر عصاره کدو تنبل (*Cucurbita pepo*) و β 17- استرادیول (E_2) بر روی محور HPG در جنس نر ماهی گورامی سه خال مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر عصاره کدو تنبل بر سطوح هورمون‌های جنسی و نیز بررسی تغییرات بافت کبد بود. بدین منظور ۱۰۰ قطعه ماهی نر نابالغ با میانگین وزنی $2/5 \pm 0/5$ گرم در ۱۰ گروه تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند. ماهیان در گروه‌های مختلف تحت تیمار، با عصاره تخم کدو تنبل و E_2 بطور جداگانه (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی) و نیز دو گروه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. کنترل ۱ دریافت کننده ۲۰ میکرولیتر متا نول و کنترل ۲ بدون تزریق بودند. ۲۰ روز پس از پایان آزمایش ماهیان تشریح شدند. هورمون‌های استرادیول و تستوسترون و همچنین یون Ca^{+2} مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی حاصل از مقایسه سطح هورمون‌های استرادیول و تستوسترون و همچنین یون Ca^{+2} اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای I و II با، تستوسترون (۱/۱)، استرادیول (0/83)، یون Ca^{+2} (۱۹/۷۳)، تیمار III با تستوسترون (۱/۳۴)، استرادیول (۱/۳۹۶)، یون Ca^{+2} (۲۰/۶۵)، تیمار IV با تستوسترون (۱/۸)، استرادیول (۱/۶۸۲)، یون Ca^{+2} (۲۲/۸۶)، تیمار V با تستوسترون (۰/۸۸)، استرادیول (۲/۵۵)، یون Ca^{+2} (۲۴/۴۳)، تیمار VI با، تستوسترون (۰/۹۱)، استرادیول (۳/۵۴)، یون Ca^{+2} (۲۷/۱۵)، تیمار VII با، تستوسترون (۰/۹۷)، استرادیول (۴/۴۱)، یون Ca^{+2} (۳۰/۸۰)، تیمار VIII با تستوسترون (۱/۰۸)، استرادیول (۶/۴۵)، یون Ca^{+2} (۳۵/۳۲) که به ترتیب دریافت کننده دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم عصاره تخم کدو تنبل و ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم E_2 بودند. در مقایسه با گروه شاهد، تستوسترون (۰/۷۸)، استرادیول (۰/۵۲)، یون Ca^{+2} (۱۶/۴۶) اختلاف معنی‌داری نشان داد. ($P < 0/05$). نتایج حاکی از تاثیر گذاری بیشتر تیمار VI و VIII بر سطح هورمون‌های تستوسترون و استرادیول و همچنین یون Ca^{+2} در مقایسه با سایر تیمارها و نیز تیمار کنترل در ماهی گورامی سه خال نر بود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره کدو تنبل احتمالاً می‌تواند سبب القای رسیدگی جنسی در جنس مذکر گردد.

واژگان کلیدی:

عصاره تخم کدو تنبل، E_2 ، ماهی گورامی سه خال

مقدمه

میزان شیوع بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان‌ها و استئوپروز در کشورهای مختلف متفاوت است. فاکتورهای اتیولوژی زیادی در میزان این تفاوت دخالت دارند که از جمله می‌توان خصوصیات نژادی، رژیم غذایی و نحوه زندگی را نام برد. نقش رژیم غذایی در جوامع عمومی بسیار زیاد است چون غذاها حاوی ترکیبات فعال بیولوژی متفاوت هستند (Mazur, 2000). مثال بارز مواد فعال بیولوژی فیتواستروژن‌ها هستند. فیتواستروژن‌ها از دسته متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که ساختار و عملکرد مشابه به 17β -استرادیول دارند و بعلاوه اثرات سودمند آنها به عنوان آگونیست استروژنیک، یا آنتی استروژنیک در سلامت و بیماری مورد توجه می‌باشند (Adams, 1995). این ترکیبات اولین بار در دهه‌ی ۱۹۴۰ شناخته شدند. در سال ۱۹۵۴، ۵۳ گونه گیاه به عنوان گیاهان دارای فعالیت استروژنی معرفی شدند. در سال ۱۹۷۵ تعداد آنها به ۳۰۰ گونه رسید (Lotke, 1998). فیتواستروژن‌ها به سه گروه لیگنان، ایزوفلان‌ها و کومستان‌ها تقسیم می‌شوند (Korpela, 1995) که درغلظت‌های بالا در گیاهان همچون خانواده لگومیناسه یافت می‌شود (Dixon, 2004). فیتواستروژن‌ها از لحاظ فعالیت بیولوژیکی همانند استروژن‌های آندوژنی می‌باشند و منجر به اثرات استروژنیک می‌شوند و به عنوان آنتاگونیست استروژنی، ممکن است رسپتورهای استروژنی را مسدود نموده و از فعالیت استروژنی جلوگیری و منجر به اثرات آنتی استروژنیک شوند (Brzozowski, 1997). استروژن‌ها بطور عمده موجب تکثیر و رشد سلول‌های ویژه‌ای می‌شوند که مسئول پیدایش صفات جنسی ثانویه هستند. سه استروژن 17β -بتا استرادیول، استرون و استریول با مقادیر قابل ملاحظه‌ای در پلاسما افراد مونث وجود دارد. استروژن اصلی مترشح از تخمدان‌ها 17β -بتا استرادیول است. مقادیر اندکی استرون نیز ترشح می‌شود، اما قسمت اعظم استرون در بافت‌های محیطی توسط قشر فوق کلیه و سلول‌های تکای تخمدان‌ها تشکیل می‌شود. قدرت استروژنی بتا استرادیول ۱۲ برابر استرون و ۸۰ برابر استریول است. در نتیجه اثر استروژنی بتا استرادیول چندین برابر مجموع آثار دو هورمون دیگر است، به همین سبب، بتا استرادیول به عنوان استروژن اصلی در نظر گرفته می‌شود (Anstead, 1997).

دانه‌های کدوتنبل به عنوان یک دیورتیک ضعیف بوده و بی‌اختیاری ادرار را در کودکان درمان می‌کند (Dreikorn, 2002) همچنین از دانه‌های کدو تنبل برای جلوگیری از سرطان معده، به عنوان ملین و نیز درمان بیماری‌های ریوی استفاده می‌شود (Lamg, 1996). همچنین در درمان و جلوگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی، کاهش کلسترول نیز کاربرد دارد (Murkouiz, 2004).

مهم‌ترین ترکیبات عصاره تخلیص شده تخم کدو تنبل حاوی روغن چرب اشباع نشده، ویتامین E و فیتواسترول می‌باشد (Gliessman, 1998). علاوه بر این ترکیبات، حاوی مواد معدنی، پیگمان‌ها و ترکیبات فنولیک نیز می‌باشد (Ellworth, 1970). امروزه روغن تخم کدو تنبل بعنوان درمان رایج و موثر در بزرگی خوش خیم پروستات (Benign Prostatic Hyperplasia) BPH (می‌باشد) (Bancroft, 1996).

Mendiol و همکاران (2006) گزارش کردند که عصاره کدو تنبل باعث بهبود هورمون‌های مترشح از بافت بیضه می‌شود و به همین دلیل احتمالاً در ناباروری جنس مذکر می‌تواند اثر بخش می‌باشد. Bearden و همکاران (2005) گزارش کردند که عصاره کدو تنبل شمار اسپرم‌های غیر طبیعی را کاهش می‌دهد و در پیشگیری و درمان ناباروری جنس مذکر می‌تواند اثر بخش باشد.

با توجه به نتایج مطالعات انجام شده، تحقیق حاضر بر مبنای استفاده از عصاره تخم کدو تنبل و E_2 بر روی محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد در جنس نر ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از بهمن لغایت اسفند ماه ۱۳۸۹ در آزمایشگاه ماهی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی انجام گرفت. بدین منظور E2 با درجه خلوص ۸۰ درصد از شرکت داروسازی ابوریحان تهیه شد. همچنین عصاره گیری از تخم کدو تنبل با استفاده از روش خیساندن (Maceration) و با به کار بردن حلال متانول انجام شد. پس از کلر زدایی آب آکواریوم‌ها ۱۰۰ عدد ماهی در ۱۰ گروه مجزا و هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی در آکواریوم به ابعاد ۶۰×۴۰×۳۰ سانتی متر و در ۴۰ لیتر آب رها سازی شدند. سازگار سازی ماهیان با محیط طی مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب قبل از شروع آزمایش، در زمان آزمایش و در پایان کار اندازه گیری شد. نوسان دما در 26 ± 3 درجه سانتی گراد، pH (۵/۸-۷/۴)، درجه سختی (۵۰-۱۰۰) میلی گرم در لیتر کلسیم کربنات تنظیم گردید و تغذیه با استفاده از غذای غنی شده (tetra vegetable) انجام شد. آزمایش‌ها در ۱۰ گروه، شامل ۸ گروه تیماری عصاره کدو تنبل و نیز E2 به طور جداگانه (۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن بدن ماهی) و دو گروه شاهد (متانولی و دست نخورده) انجام شد (Ng et al., 1997). پس از بیهوش کردن ماهی‌ها تزریق با استفاده از عصاره آویشن با نام تجاری PI_{۲۲۲} (تهیه شده از شرکت پارس ایمن دارو) در عضله ی زیر باله پشتی به میزان ۲۰ میکرو لیتر صورت گرفت (Naji et al., 2008). برای انجام تزریق، عصاره کدو تنبل و E2 به طور جداگانه در متانول حل شد. تزریق در هر ماهی به میزان ۲۰ میکرو لیتر و فاصله تزریق در گروه‌های دریافت کننده عصاره کدو تنبل و E2 یک روز در میان انجام گرفت. پس از انجام تزریق ها، ماهی‌ها هر ۲۴ ساعت یکبار بررسی شدند. در پایان روز بیستم از هر تیمار تعداد ۱۰ عدد ماهی جدا و بیهوش شدند. برای اندازه گیری سطوح استروئیدی هورمون‌های استرادیول و تستوسترون و یون Ca^{2+} (با توجه به کوچک بودن اندازه ماهیان امکان تهیه خون به روش متداول خونگیری وجود نداشت) به روش له کردن، بافت‌های نمونه‌های هر تیمار جداگانه له شده و مایعات بافتی توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی گردید. اندازه گیری هورمون‌های استرادیول و تستوسترون با واحد نانو گرم در میلی لیتر با روش Radio immunoassay بر اساس واکنش رقابتی بین هورمون موجود در نمونه با هورمون نشاندار شده با ید رادیو اکتیو ۱۲۵ جهت اتصال به آنتی بادی ضد هورمون در فاز جامد بود. پرتودهی حاصل از اتصال با گاما کانتور LMB ساخت فنلاند اندازه گیری شد. میزان پرتودهی در این واکنش‌ها با غلظت هورمون رابطه عکس دارد. برای کالیبره کردن و کنترل تست‌های فوق از استانداردها و کنترل تجارتي استفاده شد. جهت اندازه گیری یون Ca^{2+} ، کلسیم در مجاورت متیل تیمول بلو ایجاد رنگ می‌کند و غلظت آن متناسب با مقدار یون Ca^{2+} است. کلسیم با اتو آنالایزر Technicon و در طول موج ۶۲۰ نانو متر اندازه گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلاف مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS و روش آماری t-test، آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و Duncan استفاده شد. برای ترسیم نمودار از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

در بررسی نتایج حاصل از مقایسه سطوح استروئیدهای جنسی، میزان تستوسترون ماهیان تحت تیمار با عصاره کدو تنبل در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار بتا استرادیول افزایش یافت و در بین تیمارهای عصاره کدو تنبل، مقدار این هورمون در تیمار چهارم با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشتر از سه تیمار دیگر بود. از تیمار اول تا تیمار چهارم به تدریج با افزایش دوز ۵۰-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم که به آنها تزریق شده بود، میزان تستوسترون از ۰/۹۷۲ تا ۱/۷۹۶ افزایش یافت و در مقایسه با یکدیگر ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). جدول (۱) میزان تستوسترون را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۱- مقایسه میانگین هورمون تستوسترون در تیمارهای مختلف ماهی گورامی سه خال

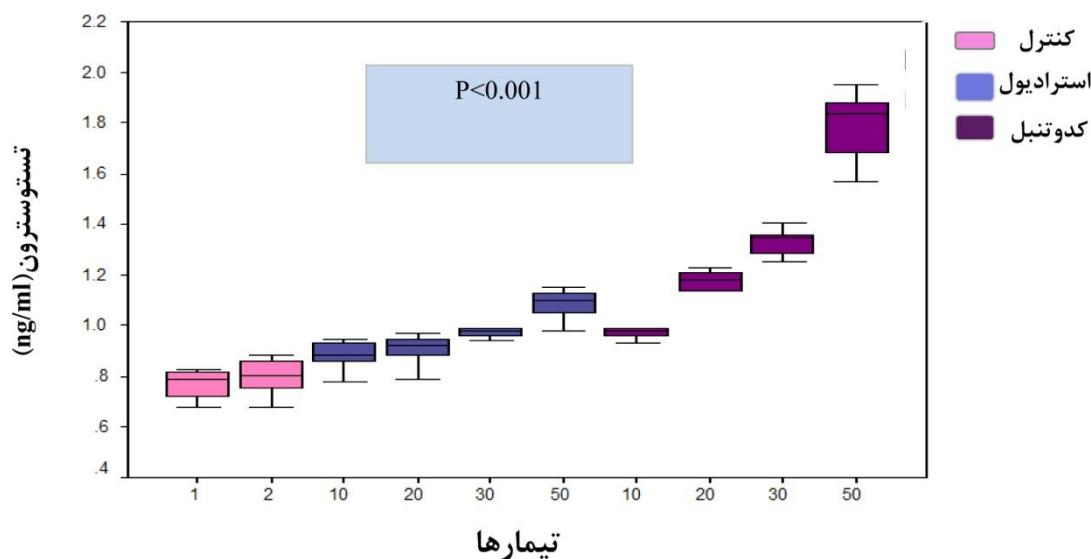
شماره تیمار	تیمارها	میانگین هورمون تستوسترون	P-value
I	کدو تنبل ۱۰	۰/۹۷۲±۰/۰۲۲	
II	کدو تنبل ۲۰	۱/۱۴۶±۰/۱۰۳	<۰/۰۰۱*
III	کدو تنبل ۳۰	۱/۳۴۴±۰/۰۴۹	
IV	کدو تنبل ۵۰	۱/۷۹۶±۰/۱۲۱	
V	E2،۱۰	۰/۸۸۰±۰/۰۵۸	
VI	E2،۲۰	۰/۹۰۹±۰/۰۵۵	<۰/۰۰۱*
VII	E2،۳۰	۰/۹۷۳±۰/۰۱۸	
VIII	E2،۵۰	۱/۰۸۲±۰/۰۶۰	
IX	کنترل I متانول ۲۰ μL	۰/۷۶۹±۰/۰۵۹	۰/۲۸۴**
X	کنترل II شاهد، بدون تزریق	۰/۸۰۰±۰/۰۶۶	

توضیح: واحد تیمارهای I تا VIII بر حسب mg/kg می‌باشد.

* ANOVA

** t-test

داده‌ها نشان داد که میزان تستوسترون در گروه‌های تحت تیمار با 17β -استرادیول به مقدار خیلی جزئی بیشتر از گروه‌های کنترل بود و تقریباً در یک سطح قرار داشتند و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ($P < 0.001$) وجود داشت (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین هورمون تستوسترون بین تیمارهای مختلف کدو تنبل و 17β -استرادیول و

کنترل‌ها در ماهی گورامی سه خال

(آنتیک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است)

نتایج حاکی از آن بود که میزان استرادیول در ماهیان تحت تیمار با 17β -استرادیول در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های تیمار با عصاره کدو تنبل افزایش یافت و بین تیمارهای 17β -استرادیول مقدار این هورمون در تیمار چهارم با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم خیلی بیشتر از سه تیمار دیگر بود. بین تیمار اول تا تیمار چهارم که به ترتیب دوز ۵۰-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم 17β -استرادیول که به آنها تزریق شده بود، به تدریج میزان استرادیول از

۲/۵۵ تا ۶/۴۵ افزایش یافت و در مقایسه با یکدیگر ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). جدول (۲) میزان استرادیول را در تیمارهای مختلف نمایش می‌دهد.

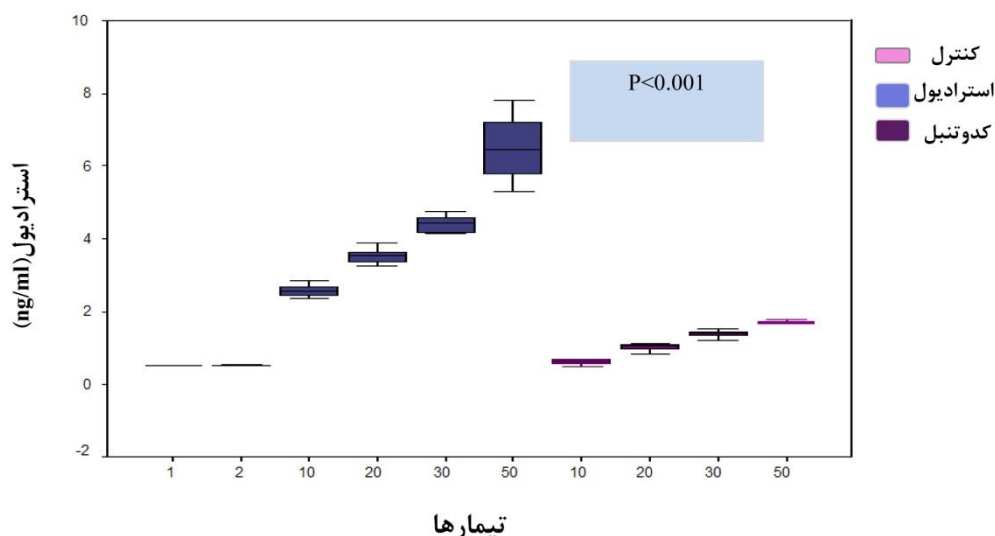
جدول ۲- مقایسه میانگین استرادیول در تیمارهای مختلف در ماهی گورامی سه خال

شماره تیمار	تیمارها	میانگین استرادیول	P-value
I	کدو تنبل ۱۰	0.621 ± 0.073	$< 0.001^*$
II	کدو تنبل ۲۰	1.032 ± 0.113	
III	کدو تنبل ۳۰	1.396 ± 0.106	
IV	کدو تنبل ۵۰	1.682 ± 0.068	
V	E2, 10	2.550 ± 0.219	$< 0.001^*$
VI	E2, 20	3.540 ± 0.223	
VII	E2, 30	4.410 ± 0.219	
VIII	E2, 50	6.450 ± 0.819	
IX	کنترل I متانول ۲۰ μ L	0.517 ± 0.09	0.281^{**}
X	کنترل II شاهد، بدون تزریق	0.523 ± 0.014	

توضیح: واحد تیمارهای I تا VIII بر حسب mg/kg می‌باشد.

* ANOVA

** t-test



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین استرادیول بین تیمارهای مختلف کدو تنبل و 17β - استرادیول و کنترل‌ها در ماهی گورامی سه خال (آنتیک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است)

یافته‌ها نشان داد که میزان استرادیول در گروه‌های تحت تیمار با عصاره کدو تنبل در مقایسه با گروه‌های کنترل به مقدار جزئی بیشتر بود (شکل ۲). اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ($P < 0.001$) وجود دارد. نمونه‌ها پس از ۱۰ روز تزریق عصاره کدو تنبل و نیز تزریق بتا استرادیول به طور جداگانه، برای تعیین میزان یون کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانگونه که نتایج ارائه شده در جدول (۳) نشان می‌دهد، یون کلسیم ماهیان تحت

تیمار با بتا استرادیول در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار با عصاره کدوتنبل افزایش یافت و بین تیمارهای دریافت کننده 17β -استرادیول مقدار این یون در تیمار چهارم با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بسیار بیشتر از سه تیمار دیگر بود. از تیمار اول تا چهارم که دوز ۵۰-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به آنها تزریق شده بود، مقدار یون کلسیم از ۲۴/۴۳۰ تا ۳۵/۳۲۰ میلی گرم بردسی لیتر افزایش یافت که در مقایسه با یکدیگر ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۳- مقایسه میانگین یون کلسیم در تیمارهای مختلف در ماهی گورامی سه خال

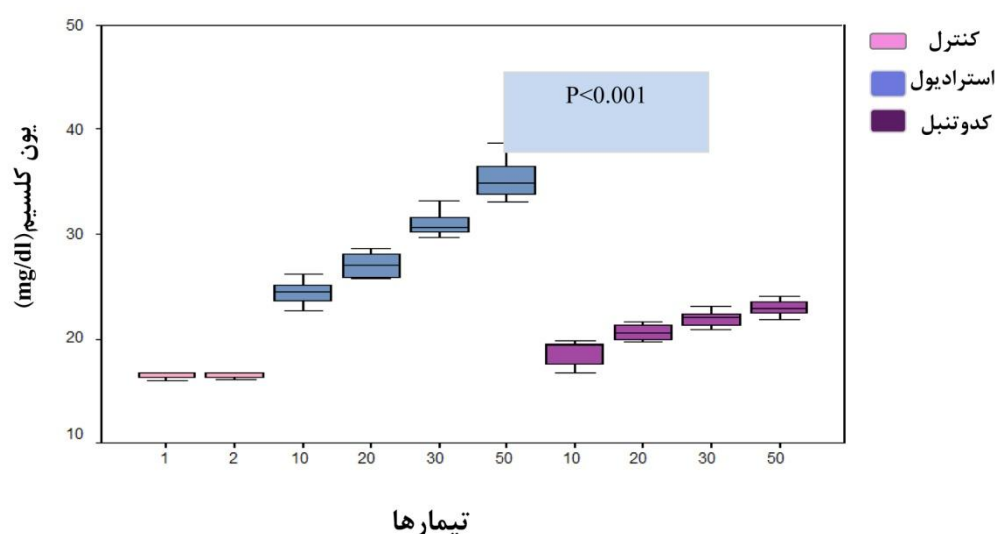
شماره تیمار	تیمارها	میانگین یون کلسیم	P-value
I	کدو تنبل ۱۰	$18/810 \pm 1/113$	
II	کدو تنبل ۲۰	$20/650 \pm 0/688$	< 0.001
III	کدو تنبل ۳۰	$21/900 \pm 0/660$	
IV	کدو تنبل ۵۰	$22/860 \pm 0/723$	
V	E2,10	$24/430 \pm 1/114$	
VI	E2,20	$27/150 \pm 1/174$	< 0.001
VII	E2,30	$30/800 \pm 1/332$	
VIII	E2,50	$35/320 \pm 1/884$	
IX	کنترل I متانول ۲۰ μ L	$16/44 \pm 280$	0.750
X	کنترل II شاهد، بدون تزریق	$16/48 \pm 0/274$	

توضیح: واحد تیمارهای I تا VIII بر حسب mg/kg می‌باشد.

* ANOVA

** t-test

نتایج حاصل نشان داد که که میزان یون کلسیم در گروه‌های تحت تیمار با عصاره کدو تنبل به مقدار جزئی بیشتر از گروه‌های کنترل بود (شکل ۳). اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح ($P < 0.001$) تایید شد.



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین یون کلسیم بین تیمارهای مختلف کدو تنبل و 17β -استرادیول و کنترل‌ها در ماهی گورامی سه خال

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از مقایسه سطح استروئیدهای خونی و کلسیم بین تیمارهای مختلف نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده عصاره کدو تنبل میزان تستوسترون بیشتر از تیمارهای دریافت کننده 17β —استرادیول و گروه شاهد بود. علاوه بر این در تیمارهای دریافت کننده عصاره کدوتنبل، بتدریج با افزایش دوز میزان تستوسترون نیز افزایش یافت، نتایج حاصل از مقایسه گروه‌های شاهد ۲۱ که به ترتیب دریافت کننده $20\mu\text{L}$ متانول و دست نخورده بودند، اختلاف معنی‌داری از نظر سطح استروئیدهای خونی و Ca^{+2} نشان نداد ($P \geq 0.05$). این امر بیانگر بی‌تاثیر بودن ترکیب‌های به کار رفته بر سطح استروئیدها و Ca^{+2} بود. بررسی نتایج حاکی از آن است که تیمارهای عصاره کدوتنبل از نظر سطح هورمون تستوسترون دارای اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به تیمارهای E2 و گروه‌های شاهد بودند ($P < 0.05$). این نتیجه نشان داد که عصاره کدو تنبل توانایی القای جنسی در ماهی گورامی را دارا می‌باشد. عصاره کدوتنبل آنزیم 5α —ردوکتاز را مهار می‌کند و مانع از تبدیل تستوسترون به دی‌هیدروتستوسترون می‌شود (Akang, 2010 Abdel-Rahman, 2006). بررسی نتایج بدست آمده از مقایسه سطح هورمون استرادیول و یون Ca^{+2} بین تیمارهای مختلف نشان داد که تیمارهای دریافت کننده E2 از نظر سطح هورمون استرادیول یون Ca^{+2} دارای اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به تیمارهای عصاره کدوتنبل و گروه‌ها کنترل بودند ($P < 0.05$). برطبق مطالعاتی که Couch (1987) Sudha و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام دادند سطوح استروئیدی 17β —استرادیول و پروژسترون را در بافت تخمدان و لنف خونی نوعی خرچنگ به نام *Scylla serrata* بررسی کرده و ارتباط آن را با مرحله زرده سازی در کبد و افزایش وزن کبد سنجیدند و گزارش نمودند که در شروع زرده سازی سطوح هر دو استروئید به شدت در بافت‌ها افزایش یافت و لی سطح استرادیول بیشتر در سلول‌های کبدی و سطح پروژسترون در تخمدان زیاد شده بود. در مطالعاتی مشابه Hobby & Pankhurst در سال ۱۹۹۷ بر روی دو نوع ماهی دریایی *Chromis dispilus* و *Pangrus auratus* انجام دادند و با استفاده از پلاسمای ماهیان، سطوح استرادیول را به عنوان شاخص مهم غیرمستقیم در روند زرده سازی اندازه‌گیری نمودند. مطالعاتی که Mugiya و Yeo در سال ۱۹۹۷ بر روی ماهی انجام دادند، نشان داد در روند زرده سازی در کبد که به وسیله استرادیول القا می‌شود، سطح کلسیم پلازما یک فاکتور مهم می‌باشد. در مطالعات مشابه که توسط Persson در همان سال انجام شد، حاکی از این بود که در زمان زرده سازی در کبد ماهی، کلسیم پلازما در بالاترین سطح قرار دارد. در مطالعات مشابه توسط Sumpter و همکاران در سال ۱۹۹۵ و سپس توسط Folmar در سال ۱۹۹۶ و پس از آن توسط Tyler و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت، همگی حاکی از آن بود که ویتلوژنین عموماً در ماهی نر یافت نمی‌شود ولی در معرض استروژن القا می‌شود. در مطالعه حاضر در کبد ماهی‌هایی که تحت تیمار با 17β —استرادیول بودند ساختن ویتلوژنین القا شد و به تدریج با افزایش دوز استرادیول، سطح هورمون‌های استروژنیک بالا رفته و میزان زرده زایی افزایش یافت. نتیجه این بررسی با نتایج سایر مطالعات بدست آمده در القای ویتلوژن در کبد مطابقت دارد. کبد ماهی‌های نر گورامی سه‌خال وقتی در معرض استروژن قرار گرفتند، زرده سازی در آنها صورت گرفت. از آنجایی که در روند زرده زایی حضور یون Ca^{+2} بعنوان یک شاخص مهم تایید شده است سطوح یون کلسیم در تیمارهای استرادیول بیشترین سطح را نسبت به گروه‌های تحت تیمار با عصاره کدوتنبل و گروه شاهد داشت.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره کدو تنبل احتمالاً می‌تواند سبب القای رسیدگی جنسی در جنس مذکر گردد و همچنین بنظر می‌رسد که در باروری جنس مذکر نیز مفید باشد. علاوه بر این کبد جنس مذکر وقتی در معرض استروژن به ویژه در دوزهای بالا قرار می‌گیرد، سطح کلسیم افزایش یافته و زرده سازی صورت می‌گیرد.

منابع

- Abdel-Rahman, M. K. 2006. African *Cucurbita pepo* L. *propertis* of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*, 1(1):33-40.
- Adams, N.R. 1995. Detection of the effect of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim Sci.*, 73:1509-1515.
- Akang, E. N. 2010. The effect of fluted pumpkin (*Telferia occidentalis*) seed oil (FPSO) on testis and semen parameters. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 45:2151-2155.
- Anstead, G.M. & Burgess, H. 1997. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationship and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 62:268-303.
- Bancroft, D., Stevens, A. & Tuner, R. 1996. *Theory practice of histological techniques*. 4th Ed. Williams & Wilkins. London.
- Bearden, H.J. & Fuquay, J.W. 2005. *Applied animal reproduction*. 4th Ed. Prentice Hall. New Jersey.
- Brzozowski, A.M., Joannou, G.E. & Reeder, A.Y. 1997. Molecular basis of agonist and antagonist in the estrogen receptor. *Nature*, 389:753-758.
- Couch, E. F., Thornton, J. W., Crews, D. Skipper, J.K., Dotte, A. & Thomas, P. 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissue of the lobster (*Homarus americ*) with Developing and immature ovaries. *Comp. Biochem. physiol.*, 32: 765-771.
- Dixon, R.A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of plant Biology*, 25: 225-231.
- Dreinkorn, K. 2002. The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *World ural.*, 48:416-423.
- Ellsworth, R.K. 1970. Simple method for separation of milligram quantities of protochlorophyll a form seed oils in extracts of whole pumpkin seeds. *Anal Biochem.*, 39:540-546.
- Folmar, L., Ethan, D., Rodrigue, Z. & Alison, C. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental health perspectives*, 6:104-109.
- Gliessman, S.R. 1998. *Agroecology: Ecological processes in sustainable agriculture*. CRC Press. USA.
- Hobby, A.C. & Pankhurst, N.W. 1997. Comparison of mammalian and fish cell line cytotoxicity impact of endpoint and exposure duration. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16.1:65-75.
- Korpela, R. 1995. Role of rye fiber and lactobacillus GG in colonic metabolism. PhD thesis. Kuopio University, Finland.
- Lamg, A. & Foster, S. 1984. *Encyclopedia of natural ingredients used in food*. 2nd Ed. Wiley. New York.
- Lotke, P.S. 1998. Phytoestrogens: A potential role in hormone replacement therapy. *Prim. Care Update ob/Gyns.*, 5(6):290-295.
- Mazur, W. & Adlercreutz, H. 2000. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition*, 16(718):654-658.
- Marnie, L. & Jobling, S. 1984. Fatty acid synthesis in testes of fat-deficient and fat supplemented in rat. *J. Nutr.*, 107:79-86.
- Mendiol, J. & Lubberink, K. 2009. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertility and Sterility*, 93(4) : 1128-1133.
- Murkouiz, M. & Liley, N. 2004. Changes in chemical composition of pumpkin seeds, during the roasting for production of pumpkin seed oil part 1: Non-volatile compounds. *Food Chem.*, 84:359-365.
- Naji, T., Nejatkhah Manavi, P. & Shirinabady, M. 2008. The role of hormonal treatment of 17 β -estradiol valerat in sex differentiation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Marine Sciences and Technology Research*, 3(2): 57-66.
- Ng, N.K., Tsi, D. & Munro, A.D. 1997. Induced final maturation and ovulation in a small anabantoid teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*). The modulatory effects of monoaminergic and opioid drugs on the responsiveness to LHRH_α. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1: 199-215.
- Nwangwa, E.K. 2007. Effect of aqueous extract of *Telfairia occidentalis* (pumpkin) on hematological parameter of rat. *Sci.* 72:4425-4429.
- Oyeyemi, M.O., Burgess, W., Pronek, N. & Walls, S. 2008. Sperm morphological studies of the West African Dwarf Buck treated with pumpkin plant (*Cucurbita pepo*). *Int. J. Morphol.*, 26(1):121-126.

-
- Persson, P. & Meyers, S. P. 1997. Esteradiol and nutritional status affect calcium balance, scale and bone resorption and bone formation in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Comp. Physiol., 167:468-473.
- Sudha, Becker, L., Hayanes, K., 2001. 17β -esteradiol and nutritional status effect calcium balance, scale and bone resorption and bone formation in Rainbow trout. Department of Zoology, Invertebra reproduction Department. University of Madras. India.
- Sumpter, J. & Jobling, S. 1995. Vitellogen as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environment Health Prepective, 3: 103-107.
- Tyler, C. & Lubberink, K. 1996. Identification of four ovarian receptor proteins that bind vitellogenin but not other homologous plasma lipoproteins in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. of Comparative Physiology, Biochemical, Systemic and Environmental Physiology, 166:11-20.
- Yeo, I.K. & Mugiya, Y. 1997. Effect of extracellular calcium Concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by 17β -esteradiol in primary hepatocyte culture in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Com. Endocrinol., 105:294-301.