بررسی اثر ایزوفلاون های روغن سویا بر رشد و رسیدگی اووسیت ها در ماهی گورامی سه خال ماده نابالغ (*Trichogaster trichopterus*)

طاهره ناجی*[۱]، همایون حسین زاده صحافی[۲]، محمد کریم جاذبی زاده[۳] و زهره ثمری[۴]

۴و۳و۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

۲- موسسه تحقیقات شیلات

*عهده دار مکاتبات:naji.t@iaups.ir

چکیده

در این تحقیق اثرات ایزوفلاون های روغن سویا بر رشد و رسیدگی اووسیت ها در ماهی گورامی نابالغ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از کلر زدایی آب ، ماهیان با وزنی۲/۵- ۱/۵گرم در آب رها شدند. سازگار سازی ماهیان با محیط، به مدت یک هفته انجام شد.

سپس آزمایش ها در ۷ تیمار (۲ تیمار شاهد و ۵ تیماراصلی) که هر گروه شامل ۱۰ قطعه ماهی با وزن ۲/۵-۱/۵ گرم بود،انجام گرفت. ماهیان هرتیمار، پنج دوز از روغن سویا با مقادیر ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰میکروگرم برکیلوگرم را به صورت تزریق در عضله زیر باله پشتی (IM) و به مقدار ۰/۰۲ میلی لیتر دریافت نمودند و پس از گذشت یک هفته ماهیان تشریح و تخمدان آنها خارج گردیده، و در فرمالین ۱۰ در صد فیکس گردید. سپس مراحل پاساژ بافت صورت پذیرفت ومقاطع بافتی با دستگاه میکروتوم با ضخامت ۸ میکرومتر تهیه و رنگ آمیزی با H&E انجام گرفت . سپس میانگین درصد شاخص گنادی، درصد فراوانی سلول های بالغ و نابالغ درتخمدان، میانگین، قطر بزرگترین و کوچکترین تخمک های بالغ و نابالغ و ساختار بافت شناسی ماهیان هر تیمار با گروه شاهد مقایسه گردید.

میانگین درصد شاخص گنادی در تیمار شاهد و کنترل۵/۷ درصد بود و در تیمار پنجم به ۷/ ۶(با غلظت ۱۰میکرو گرم در کیلو گرم)در صد رسید.هم چنین با افزایش دوز محلول ، در صد فراوانی سلول های بالغ و افزایش قطر تخمک های بالغ مشاهده شد.بررسی نتایج حاصل از مقایسه موارد فوق بین تیمارهای مختلف از نظر فاز تکاملی غالب اووسیت ها در هر گروه نشان داد، که استفاده از ایزوفلاون های روغن سویا می تواند سبب تسریع بلوغ نهایی در ماهی گورامی سه خال شود و این تأثیر در دوزهای بالاتر روغن سویا بارزتر بود.

واژگان کلیدی: روغن سویا، ایزوفلاون، تخمدان، *Trichogaster trichopterus*

مقدمه

تولید مثل در ماهیان توسط محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان کنترل می شود. زنجیروار بودن این مکانیسم امکان مداخله کردن ماده مورد آزمایش رادر چند سطح جهت القاء تخمک گذاری و پیش رس کردن ماهیان به وجود می آورد. اولین مطالعات استفاده از هورمون در ماهیان توسط Pifferer انجام شد.

توانایی استروئیدهای طبیعی و ساختگی و تأثیر آن بر بافت تخمدان و رشد و رسیدگی و بلوغ آن متفاوت می باشد. Donaldson و Hunter در سال ۱۹۸۳ نشان دادند که قدرت بیشتر تجویز خوراکی استروئیدهای ساختگی در مقایسه با استروئیدهای طبیعی تا اندازه ای قابل نسبت دادن به مقاومت آنها در برابر تجزیه شدن در مدت هضم می باشد لذا هورمون های ساختگی نسبت به هورمون های طبیعی آهسته تر دفع می شوند (1983 Donaldson *et al*.).

سویا یک پروتئین گیاهی و کاملاً فاقد کلسترول است و تنهامقدارکمی چربی اشباع شده دارد.ایزوفلاون ها گروهی از ترکیبات موجود در سویا هستند که خواص استروژنی داشته و جزو استروژنهای گیاهی یا فیتواستروژن ها طبقه بندی می شوند (Kim *et al*., 2002). این فیتواستروژن ها ازنظر ساختمانی یک فنول است تا اینکه استروئید باشد (Mackeyr, Eden, 1998). دیادزپین یک پیش ساز فیتواستروژنی در سویا می باشد که از آن ایکول ماده ای با فعالیت استروژنی ضعیف متابولیز می شود(Dalais *et al*., 1998) .

دانه سویا منبع غنی از فیتواستروژن است که در هر گرم آن mg ۳-۱ ایزوفلاون موجود است. ساختمان مولکولی فیتواستروژن سویا شبیه ساختمان مولکولی ۱۷ بتا استرادیول است(Rogerio, 1999).

گورامی ها دارای انواع زیادی هستند که تعدادی از آنها در ایران تکثیر و پرورش یافته اند. نگهداری از گورامی ها کار آسان و ساده ای است چون مقاومتشان نسبت به بقیه

ماهی های آکواریومی بیشتر است . چنانچه گرسنه بمانند خیلی زود هم جنس خواری می کنند. در طبیعت گورامی ها حشرات کوچک و لاروهای سطح آب را می خورند ولی در اسارت این ماهی ها غذاهای پولکی، غذاهای خشک منجمد و قرص های سبزی می خورند.

با توجه به اینکه گیاهان حاوی فیتواستروژن فاقد اثرات منفی استروژن های صناعی می باشد انتظار می رود که می توانند جایگزین مناسبی برای آنها باشند.

در تحقیق حاضر با به کارگیری غلظت های متفاوتی از روغن سویا اثرات ایزوفلاون آن، بر رشد و رسیدگی اووسیت ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۸۷ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی صورت پذیرفت. ماهی گورامی سه خال ماده نابالغ از یکی از کارگاه های پرورش ماهیان زینتی در محلات تهیه گردید. این ماهیان دریک گروه تکثیری بودند. فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آغاز،میانه وپایان بررسی اندازه گیری گردید.دما بین ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد ، pHبین ۷/۵-۶ ودرجه سختی بین ۱۰-۴ (میلی گرم/لیتر کربنات کلسیم) تنظیم گردید. پس از کلرزدایی آب آکواریوم ها، ماهیان ماده نابالغ با دامنه وزنی ۲/۵ - ۱/۵ گرم در آب رهاسازی شده و به مدت یک هفته با محیط سازگار شدند.

آزمایش در ۷ گروه (۲ گروه کنترل و ۵ گروه تیمار) که هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی ماده نابالغ بود انجام گرفت. غلظت های مختلف روغن سویا طبق جدول(۱) به صورت IM(تزریق در عضله زیر باله پشتی) و به میزان ۰/۰۲ میلی لیترانجام شد.

جدول ۱- انواع تیمارهای مورد بررسی و غلظت های تزریقی از روغن سویادر ماهی گورامی سه خال

ردیف	تیمار	غلظت تزریقی $\mu g/kg$	تعداد ماهی
تیمار۱	روغن سویا	۱۰	۱۰
تیمار۲	روغن سویا	۲۰	۱۰
تیمار۳	روغن سویا	۳۰	۱۰
تیمار۴	روغن سویا	۴۰	۱۰
تیمار۵	روغن سویا	۵۰	۱۰

با توجه به اینکه روغن سویا پس از حل در الکل اتیلیک ، به گروه های تیمار تزریق گردید، لذا ۰/۰۲ سی سی اتانول ۹۹ در صد هم به ماهیان گروه کنترل تزریق گردید.گروه شاهد نیز بدون تزریق بود. تزریق ها به صورت عضلانی پس از بیهوش کردن ماهیان با pI_{222} (شرکت پارس ایمن دارو)در عضله زیر باله پشتی صورت گرفت.پس از تزریق ماهی های هر گروه در اکواریوم مربوط رهاسازی شد.همه تیمارها روزی یکبار بررسی شدند. در پایان روز هفتم، ماهی ها با استفاده از pI_{222} مجدداً بیهوش شده ، سپس با استفاده از خط کش بیومتری (طول استاندارد) و ترازوی دیجیتال(با دقت ۰/۰۱ گرم)(وزن) کل مورد بررسی قرارگرفت. نمونه ها سپس کشته شده و بافت تخمدان آنها خارج شد. پس از توزین تخمدان ها به تفکیک هر تیمار، تعدادی تخمدان از هر تیمار به عنوان نمونه درمحلول فرمالین ۱۰ در صد قرار داده شد و پس از انجام مراحل پاساژ بافت، برش گیری بادستگاه میکروتوم به ضخامت ۸ میکرو مترو رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین ائوزین در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند . سپس شاخص گنادی، GSI بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

که در $GSI = \frac{Wg}{W} \times 100$

آن Wg وزن گنادو و W، وزن کل بدن ماهی است(Htun-Han،1997).

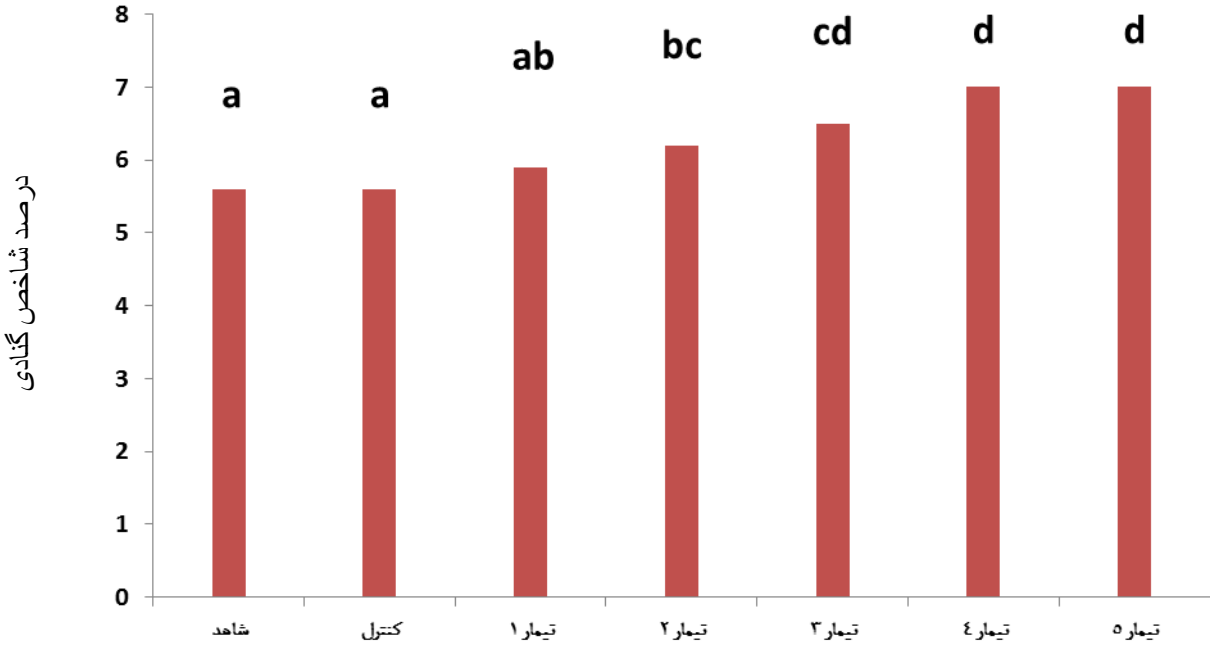
نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون Shapiro- wilk و بررسی همگنی واریانس ها با استفاده از آزمون Leven انجام شد.

بررسی و مقایسه دو به دو بین تیمارها توسط آزمون مقایسه نسبت ها (Z) و هم چنین "آزمون دقیق فیشر (Fisher's exact test) در نرم افزار Minitab 14 انجام شد.

برای نرمال کردن داده های در صد GSI ازتبدیل لگاریتمی استفاده شد.

نتایج

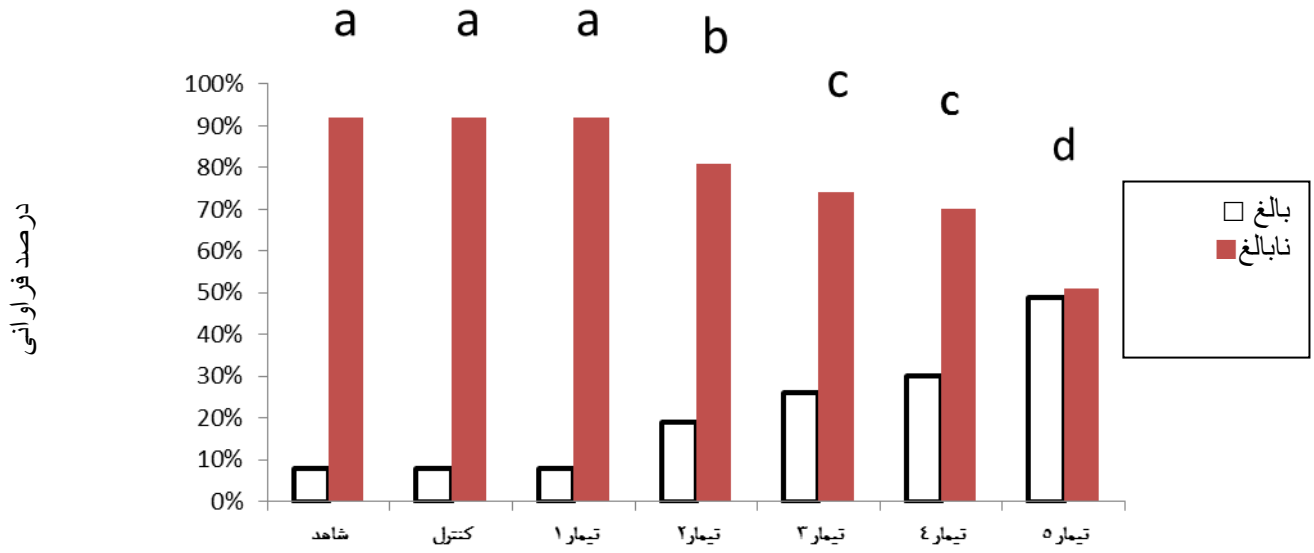
نتایج شاخص گنادی در شکل (۱) ارایه شده است. با افزایش غلظت روغن سویا شاخص گنادی نیز افزایش یافته است.



شکل۱- مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی بین گروه های مختلف ماهی گورامی سه خال

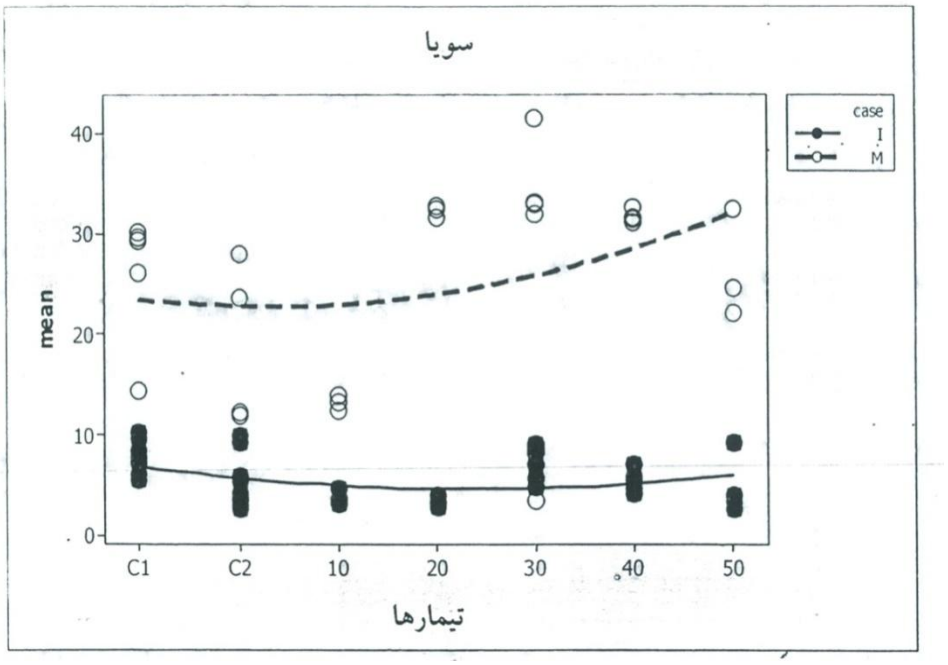
حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین هر گروه می باشد (P < ۰/۰۵) .

درصد فراوانی سلول های بالغ و نابالغ تخمدان های مورد بررسی در شکل (۲) نشان داده شده است.با افزایش دوز روغن سویا در صد فراوانی سلول های بالغ افزایش یافته است.



شکل ۲- مقایسه درصد فراوانی سلول های بالغ و نابالغ تخمدان در بین گروه های مختلف ماهی گورامی سه خال .حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین هر گروه می باشد (۰/۰۵ > P) .

در شکل (۳) پراکنش نقاط میانگین قطر بزرگ و قطر کوچک تخمک های بالغ(M) و نابالغ (I) ارائه شده اند.



شکل۳- مقایسه میانگین قطر کوچک و بزرگ تخمک های بالغ و نابالغ در بین گروه های مختلف ماهی گورامی سه خال-تیمار ها.بر اساس میکرو گرم در کیلو گرم سویا دریافت نموده اند.

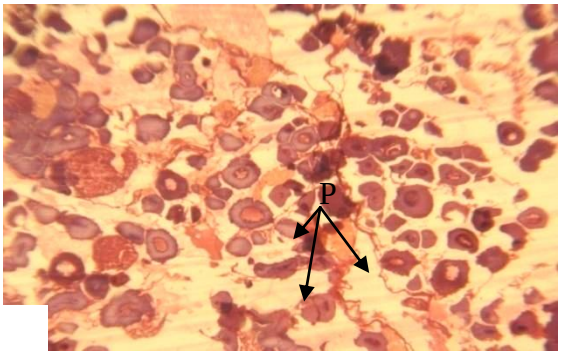
این نتایج سیر صعودی افزایش قطر تخمک های بالغ را با افزایش دوز نشان می دهد.اما در تخمک های نابالغ این روند و تا حدی سیر نزولی را نشان می دهد.

در بررسی مقاطع بافت شناسی تخمدان ماهیان گروه شاهد بافت تخمدان شامل، بافت همبند استروما وسلول های جنسی بود. سلول های جنسی غالباً شامل اووسیت هایی در مرحلهٔ پیش هستک (Perinuclear) بودند. تعداد بسیار کمی از اووسیت ها نیز در مرحله شروع زرده زایی و مراحل ابتدایی ویتلوژنز قرارداشتند(شکل ۴). در مقاطع بافتی حاصل از تیمار کنترل در مقایسه با گروه شاهد تفاوتی دیده نشد و سلول های جنسی غالباً اووسیت هایی در مرحلهٔ پیش هستک بودند. تعدادی از اووسیت ها نیز در مرحلهٔ شروع زرده زایی و مراحل ابتدایی ویتلوژنز قرار داشتند (شکل ۵).

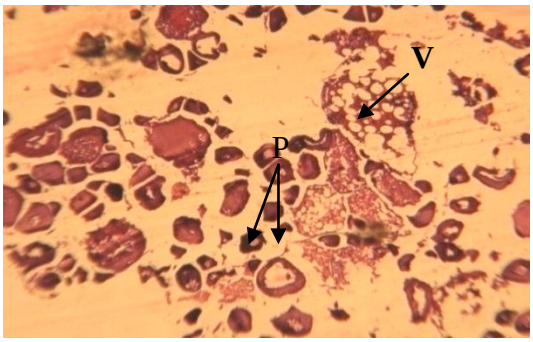
در مقایسه بین مقاطع بافتی حاصل از تیمار اول و گروه شاهد نیز همین نتایج بدست آمد و تفاوتی دیده نشد (شکل۶).در مقایسه مقاطع بافتی حاصل از تیمار دوم با گروه شاهد تعداد اووسیت های مشاهده شده در مرحله ویتلوژنز افزایش یافته ولی اغلب اووسیت ها در مرحله پیش هستک و شروع زرده زایی قرار داشتند.

وزیکول زایا در مرکز اووسیت و ذرات چربی به صورت پراکنده در اووپلاسم قابل رویت بود (شکل۷). در بررسی مقاطع بافتی حاصل از تیمار سوم با گروه شاهد سلول های جنسی غالباً شامل اووسیت هایی در مرحله پیش هستک و شروع زرده زایی مشاهده شد. وزیکول زایا در مرکز اووسیت ها و ذرات چربی در مواردی به صورت متصل به هم مشاهده شد(شکل۸).

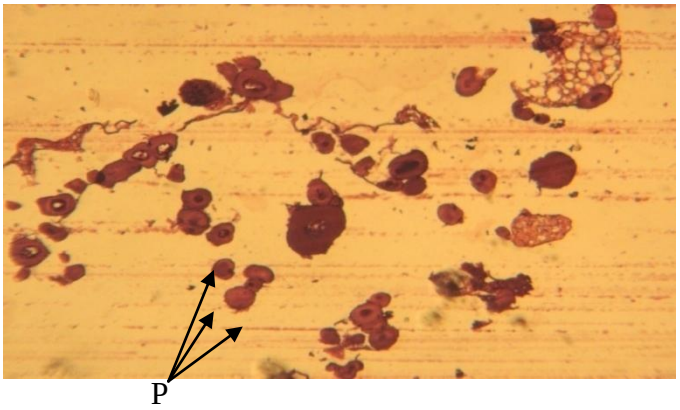
مقایسه تیمار چهارم با گروه شاهد نشان داد که تعداد اووسیت های مشاهده شده در مرحله پیش هستک به مراتب کمتر از گروه شاهد بود. اغلب اووسیت ها در مرحله ویتلوژنز و اتمام زرده زایی قرار داشتند. اتصال ذرات چربی به یکدیگر نیز مشاهده گردید (شکل ۹).



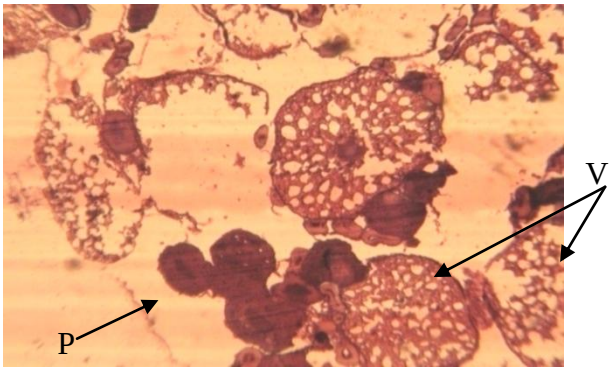
شکل٤-مقطعی از بافت تخمدان تیمار شاهد،فاز غالب اووسیتها شامل مرحله پیش هستک (p)،ماهی گورامی سه خال (H&E،٤٠٠×)



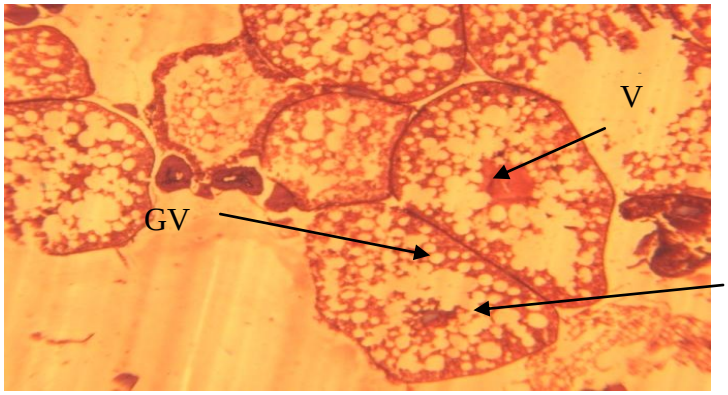
شکل ٥- مقطعی از بافت تخمدان گروه کنترل ،فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستک (p) حضور اووسیتها یی در مراحل ابتدایی ویتلوژنز(V)،ماهی گورامی سه خال (H&E،٤٠٠×)



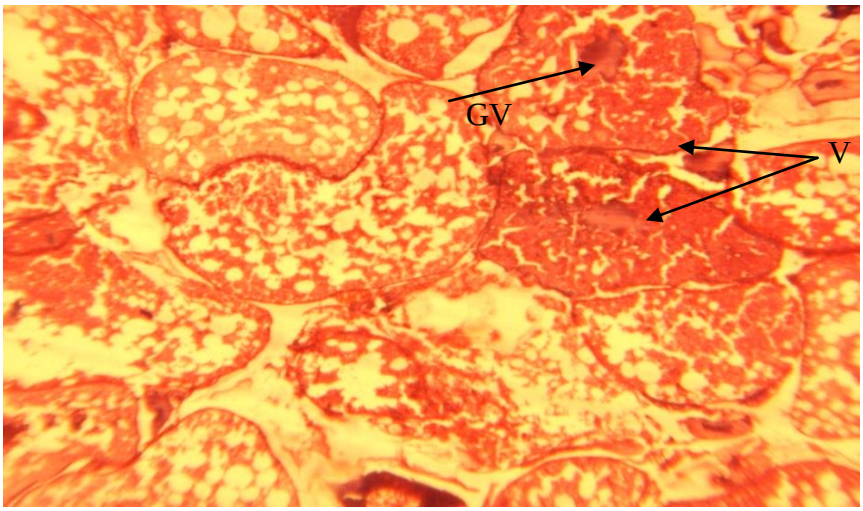
شکل٦-مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار اول ، فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستک (p)، ماهی گورامی سه خال (H&E،٤٠٠×)



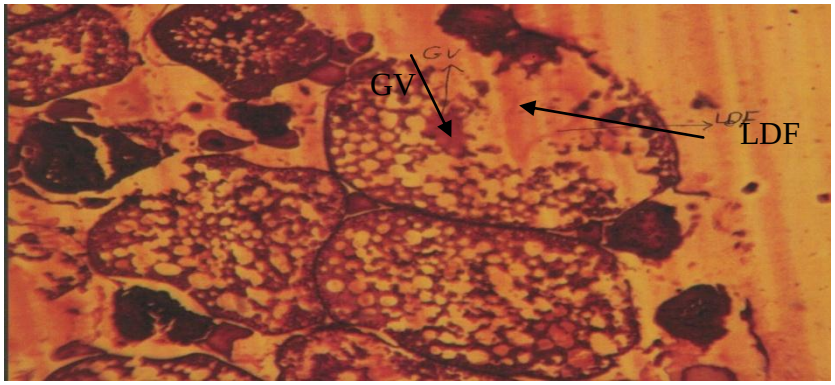
شکل ۷) - مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار دوم،فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستک (P) ،حضور اووسیت هایی در مراحل ابتدایی ویتلوژنز(v)،ماهی گورامی سه خال (H&E،٤٠٠×)



شکل۸- مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار سوم،فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله ویتلوژنز(V)، اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اووپلاسم (LDf)، حضور وزیکول زایا (GV) در مرکز اووسیت،ماهی گورامی سه خال(H&E،٤٠٠×)



شکل ۹ -مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار چهارم،فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله ویتلوژنز(V) ،حضور وزیکول زایا(GV)در مرکز اووسیت،ماهی گورامی سه خال(H&E،٤٠٠×)



شکل ۱۰ - مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار پنجم،شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری،اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اووپلاسم (LDf)،ماهی گورامی سه خال (H&E،۴۰۰×)

در مقایسه مقاطع بافتی حاصل از تیمار پنجم با گروه شاهد تعداد اووسیت های مشاهده شده در مرحله پیش هستک بسیارکمتر از گروه شاهد بود و اغلب اووسیت ها در مرحله ویتلوژنز قرار داشتند شروع حرکت وزیکول زا به سمت قطب جانوری و وجود ذرات چربی متصل به هم از نکات قابل توجه در این تیمار بود(شکل ۱۰).

بحث ونتیجه گیری

بررسی نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی بین تیمارهای مختلف و بررسی تغییرات بافت شناسی و همچنین مقایسه درصد فراوانی سلول های بالغ و نابالغ تخمدان و مقایسه میانگین قطر بزرگ و کوچک در تخمک های بالغ و نابالغ در هر گروه نشان داد که استفاده از روغن سویا می تواند سبب تسریع بلوغ نهایی ماهی گورامی سه خال شود که این تأثیر در دوزهای بالاتر روغن سویا بارزتر بود. نتایج حاصل از مقایسه گروه شاهد و کنترل از نظر درصد شاخص گنادی، تغییرات بافت شناسی، درصد فراوانی سلول های بالغ و نابالغ تخمدان و میانگین قطر بزرگ و کوچک در تخمک های بالغ و نابالغ هیچ گونه اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P> 0/05$) ، که این امر نشان دهنده بی تأثیر بودن حلال به کار رفته درروند تسریع بلوغ نهایی می باشد. در رابطه با درصد فراوانی تخمک های بالغ ونابالغ بین گروه شاهد و تیمار ۱ اختلاف معنی داری دیده نشد($P> 0/05$) .

در تیمار ۵ که بیشترین دوز را دریافت کرده بودند بیشترین درصد سلول های بالغ در مقایسه با سایر تیمارها دیده شد و در عین حال درصد سلول های نابالغ نیز به طور معنی داری کمتر شده بود($P< 0/05$) . درصد فراوانی سلول های بالغ در تیمار ۲، ۲۱ درصد ، در تیمار ۳و۴ ۲۹ در صد و در تیمار ۵ ۵۴ درصد بود. در رابطه با درصد شاخص

گنادی در گروه های مختلف با افزایش دوز اختلاف معنی داری بین تیمارهای ۳و ۲و ۱ و تیمارهای ۵ و ۴ دیده شد ($P< 0/05$). هم چنین تیمارهای ۵ و ۴و ۳ و ۲ و ۱ از نظر شاخص گنادی دارای اختلاف معنی داری نسبت به گروه شاهد بودند ($P< 0/05$). در صد شاخص گنادی در تیمار شاهد وکنترل ۵/۵ در صد،در تیمار۱ ۵/۹، در صد، در تیمار۲، ۶/۱ در صد، در تیمار ۳، ۶/۳ در صد و در تیمار ۴و۵ ۶/۸ در صد بود. جسم زرده که یک گلیکو لیپو فسفو پروتئین است با تکامل تخمک به تدریج از طریق جریان خون وارد تخمک می شود که افزایش قطر تخمک را به همراه دارد. رشد اووسیت ها وابسته به جذب گلیکولیپو فسفوپروتئین یا ویتلوژنین است که پیش ساز زرده می باشد. ویتلوژنین در پاسخ به هورمون β ۱۷ استرادیول در کبد سنتز می گردد. ویتلوژنین پس از اینکه از هپاتوسیت ها به جریان خون ترشح شد از طریق لایه های فولیکولی که اووسیت ها را احاطه نموده اند عبور می نماید.آنها با تمایل بالا به رسپتورهای ویتلوژینی در سطح اووسیت ها متصل گردیده و از طریق پدیده آندوستیور به داخل سلول راه می یابد. مشاهده شده است که همزمان با افزایش قطر فولیکول ها ، جذب ویتلوژنین نیز افزایش می یابد(Evans, 1998). مطالعات ایمانپور و صفری (۱۳۸۸) بر روی بافت گناد ماهی کپور معمولی نشان داد که افزایش وزن گناد با افزایش مقدار هورمون های استروئیدی مرتبط است. این امر را به علت افزایش ویتلوژنین (که یک فسفوگلیکو پروتئین است)، در گناد می دانند.

حبیبی در سال ۱۳۸۱ ارتباط بین هورمون های استروئیدی را با مراحل رسیدگی تخمک، ویتلوژنز، اوولاسیون و تخم ریزی بررسی کرد که این نتایج با نتایج این تحقیق که اثر یک شبه استروئید بررسی شده است همخوانی داشت. تحقیقات Scott و همکاران (۱۹۸۳)، نشان داد که ترشح گنادوتروپین توسط هیپوفیز شرط لازم برای بلوغ اووسیت ها و اوولاسیون می باشد. این عمل گنادوتروپین ها به کمک هورمون های استروئیدی صورت می گیرد.

.تغییردرسطوح هورمونβ ۱۷ استرادیول با رشد اووسیت ها در تخمدان و افزایش GSI ارتباط دارد(Lee& 2002 Yong,مقایسه میانگین قطر تخمک های بزرگ با قطر تخمک های کوچک نیز نشان دهنده افزایش میانگین قطر تخمک هابا افزایش دوز روغن سویا می باشد.

نتایج حاصل ازمقایسه تیمارهای مختلف با یکدیگر نشان داد که روغن سویا می تواند بر القای بلوغ نهایی در ماهی گورامی سه خال موثر باشد. توصیه به مصرف کمکی و در اختیار قرار دادن این گونه استروژن های گیاهی نه تنها سبب حفظ سلامت خواهد شد، بلکه از درآمدزایی و بازار مصرف مناسبی نیز برخوردار است.

با توجه به اینکه گیاهان حاوی فیتواستروژن فاقد اثرات منفی استروژن های صناعی می باشد انتظار می رود که می توانند جایگزین مناسبی برای آنها باشند. انجام تحقیقاتی مشابه این تحقیق با استفاده از گیاهان دیگر حاوی فیتواستروژن هم چون شبدر و شیرین بیان پیشنهاد می گردد.

تشکروقدردانی

بدین وسیله از سرکارخانم جوادی، تکنسین fish lab دانشکده علوم دارویی وآقای مهندس باقری مدیریت محترم شرکت مکسوی که درانجام این طرح تحقیقاتی ما را در به ثمر رساندن این مطالعه یاری نمودند، سپاسگزاری می گردد.

منابع

ایمانپور، آ. و صفری، م. ۱۳۸۸. اثر مراحل رسیدگی جنسی بر برخی شاخص های گنادی و ترکیب شیمیایی بافت گناد در ماهی کپور دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی،دانشگاه گرگان.ایران.

Dalais, F.S., Rice, G.E.& Wahlavist, M.L.1998. Effects of dietary phytoestrogens inpostmenopausal women. Climacteric, 1(2): 124- 90

Donaldson, E. &Mand Hunter, G.A. 1983. Hormonal sex control its application to fish calture ,fish physiology. 9 part B.Hoar,W.S. Academic Press, INC.New York.

Evans ,D.H. 1998. The physiology of fishes (second edition). CRC press,Amesterdam.

Htun-Han, C. 1997.The reproducetion biology of the dablimnda in the North Sea. Gonadosomatic Index, Hepatosomatic Index and condition factor. Fish Biol., 13(11): 369-378.

Kim, M.K. ,Chung, B.C.& Yo,V.Y.2002. Relationship of urinary phyto- oestrogen excretion to BMD in postmenopausal women. J.Clin Endocrinal,56 (3): 321-328.

Lee, W.K. &Yang, S.W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid.Fish Biol,63: 14-29.

Mackeyr, E. 1998.Phytostrogens and menopause. Climacteric, 1(4) : 2-8.

Pifferer, F. 1953. Endocrine sex control strategies for feminization of teleost Fish. Aquacalture,197(3-5): 229- 281.

Rogerio, A.l.1999. Treatment of the postme nopausal woman. 2th Press,USA. ed.Philadelphia:lippincott, Academic

Scott, A.P. ,Sumpter, S.P.& Hardiman, P.A.1983. Hormone changes during ova lotion in the rainbow trout salmogaridenri. General and Comparative Endocrin., 49:129-134.

2007. Menopause in: Berek and Novak' gynecology. 14th ed. **Shifren, J.L.** Press. Philadelphia. Academic