دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان‌نامه جهت دریافت درجه دکتری شیلات

اثرات جایگزینی پودرماهی با پودرسویا بر روند فعالیت هورمون‌های استروئیدی جنسی، تکامل گنادی و کیفیت سلول‌های‌جنسی ماهی‌قرمز، *Carassius auratus*, Linneaus 1758

تحقیق و نگارش

طاهره باقری

استاد راهنما

دکتر محمدرضا ایمانپور

استاد مشاور

دکتر ولی‌اله جعفری

تابستان 1391

چکیده

مطالعه‌ای با جایگزینی پودرسویا با پودرماهی بر روی ماهی‌قرمز به‌عنوان یک گونه‌ی مدل انجام‌شد. پایش سطح استروئیدهای جنسی نشان داد که جیره‌های آزمایشی اثر معنی داری بر سطح تستوسترون در ماهیان نر داشت ($P \leq 0/05$)، اما در ماهیان ماده اختلاف معنی‌داری در میان تیمارها در نمونه‌برداری‌های مختلف، به استثنای آخرین نمونه‌برداری، وجود نداشت ($P \geq 0/05$). غلظت استرادیول در پلاسمای ماهیان نر به استثنای دومین نمونه‌برداری، در تمام نمونه‌برداری‌ها افزایش داشت، اگرچه این افزایش در بین تیمارها معنی‌دار نبود ($P \geq 0/05$)، در حالی‌که سطح استرادیول پلاسمای ماهیان ماده در دومین و چهارمین نمونه برداری، در میان ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P \leq 0/05$). ازطرفی، جیره‌های آزمایشی اثر معنی داری بر غلظت پروژسترون پلاسما در ماهیان نر و ماده نداشت ($P \geq 0/05$). علاوه‌بر هورمون‌ها، گنجاندن پودرسویا بر شاخص گنادوسوماتیک و نمو بافت اندام‌جنسی در ماده‌ها و نرها نیز اثر منفی گذاشت. به‌طور کلی تفاوت معنی داری در غلظت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در بین تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مشاهده شد ($P \leq 0/05$)، اما تفاوت معنی‌داری در غلظت اسید فسفاتاز در میان ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های‌آزمایشی مشاهده نشد ($P \geq 0/05$). وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در میان تیمارهای آزمایشی معنی دار بود ($P \leq 0/05$)، در حالی‌که شاخص وضعیت، نسبت بازدهی پروتئین، ضریب تبدیل غذایی و بازماندگی در میان تیمارها تفاوت معنی داری را نشان نداد ($P \geq 0/05$). در پایان آزمایش، ترکیب اجزای غذایی لاشه ماهیان اختلاف معنی داری در میان تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی نشان نداد ($P \geq 0/05$). همچنین، جیره‌های آزمایشی اثر معنی داری بر میزان درصد اسپرماتوکریت، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک و تراکم اسپرم، درصد لقاح و درصد تخم‌گشایی داشته‌اند ($P \leq 0/05$)، اما حجم اسپرم، قطر تخمک و تخم و درصد بازماندگی لارو در میان ماهیان تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P \geq 0/05$). این یافته‌ها نشان داده‌اند که استفاده‌ی کامل از پودر سویا در تولید استروئیدهای جنسی و تولیدمثل ماهی تاثیرگذار است.

کلمات کلیدی: ماهی‌قرمز؛ پودرسویا؛ استروئیدهای‌جنسی؛ اندام‌جنسی؛ تولیدمثل

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

1- کلیات.....2

1-1- تولیدمثل در ماهیان استخوانی.....3

1-2- فعالسازی محور مغز-هیپوفیز-اندام جنسی در طی بلوغ.....5

1-2-1- هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین‌ها.....5

1-2-2- غده هیپوفیز.....6

1-2-3- گنادوتروپین‌ها.....6

1-2-4- استروئیدهای‌جنسی.....7

1-5- آنزیم‌های کبدی.....9

1-6- مداخله‌کننده‌های غدد درون‌ریز.....9

1-7- سویا.....9

1-8- فیتواستروژن‌ها.....10

1-8-1- مکانیزم عمل فیتواستروژن‌ها.....11

1-9- ماهی به‌عنوان یک گونه مدل آزمایشگاهی.....12

1-10- ماهی قرمز.....12

1-11- فرضیه ها.....13

1-12- هدف.....13

فصل دوم

2- مروری بر مطالعات انجام‌شده.....15

فصل سوم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

3- مواد و روش‌ها.....19
3-1- مواد.....19
3-2- روش‌ها.....20
3-2-1- تهیه لارو و پرورش آن جهت آماده‌سازی برای آزمایش.....20
3-2-2- آماده‌سازی جیره‌های‌آزمایشی.....21
3-2-3- زیست‌سنجی، تغذیه‌ی ماهیان و محاسبه شاخص‌های رشد ماهی.....22
3-2-4- تجزیه جیره‌های‌غذایی و لاشه‌ماهیان.....23
3-2-5- کنترل عوامل فیزیکی و شیمیایی آب.....23
3-2-6- محاسبه شاخص‌های رشد ماهی.....23
3-2-7- نمونه‌برداری از ماهیان به‌منظور بررسی روند آزمایش.....24
3-2-8- آزمایش بافت‌شناسی.....25
3-2-8-1- تجزیه و تحلیل بافت.....25
3-2-8-1-1- مطالعه میکروسکوپی رشد تخمدان.....25
3-2-8-1-2- مطالعه میکروسکوپی رشد بیضه.....26
3-2-9- اندازه‌گیری هورمون.....28
3-2-10- اندازه‌گیری آنزیم.....28
3-2-11- نمونه‌برداری جهت آزمایش خصوصیات تولیدمثلی.....28
3-2-12- بررسی کیفیت اسپرم.....29
3-2-12-1- حجم، اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم.....29

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

3-2-12-2- درصد تحرک و طول دوره تحرک.....30
3-2-13- بررسی کیفیت تخمک.....31
3-2-13-1- هماوری کاری.....31
3-2-14- شاخص گنادو سوماتیک.....31
3-2-15- اندازه‌گیری درصد لقاح، تخم‌گشایی لاروها و بازماندگی.....31
3-2-16- تجزیه و تحلیل‌های آماری.....32

فصل چهارم

4- نتایج.....35
4-1-تجزیه اجزای جیره‌های غذایی.....35
4-2- شاخص‌های تغذیه‌ای و ارزیابی رشد ماهی..... 35
4-3- تجزیه اجزای لاشه..... 36
4-4- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب.....37
4-5- شاخص گنادوسوماتیک..... 37
4-6- بررسی میکروسکوپی اندام های جنسی.....39
4-6-1- بررسی بافت‌شناسی تخمدان.....39
4-6-2- بررسی بافت‌شناسی بیضه.....44
4-7- پایش استروئیدهای جنسی در طول دوره آزمایش..... 48
4-7-1- غلظت تستوسترون..... 48
4-7-2- غلظت استرادیول.....50
4-7-3- نسبت غلظت استرادیول به تستوسترون.....51
4-7-4- غلظت پروژسترون.....52

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

4-8- پایش آنزیمی در طول دوره آزمایش.....54
4-8-1- آنزیم آلکالین فسفاتاز.....54
4-8-2- آنزیم اسید فسفاتاز.....54
4-9- کیفیت اسپرم.....55
4-9-1- اسپرماتوکریت.....56
4-9-2- طول دوره تحرک اسپرم.....56
4-9-3- درصد تحرک اسپرم.....56
4-9-4- حجم اسپرم.....56
4-9-5- تراکم اسپرم.....57
4-10- بررسی کیفیت تخمک.....57
4-10-1- قطر تخمک و تخم.....57
4-10-2- هم آوری.....57
4-11- تولید مثل.....58
4-11-1- درصد لقاح.....58
4-11-2- درصد تخم‌گشایی.....58
4-11-3- درصد بازماندگی لارو.....59

فصل پنجم

5- بحث و نتیجه‌گیری.....61
5-1- شاخص‌های تغذیه‌ای و ارزیابی رشد ماهی.....61
5-2- شاخص گنادوسوماتیک.....63
5-3- روند رسیدگی اندام‌های جنسی.....65

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

5-4- استروئیدهای جنسی.....66
5-5- آنزیم‌های فسفاتازی.....69
5-6- کیفیت سلول‌های جنسی و تولیدمثل.....70
5-7- نتیجه‌گیری کلی.....72
5-8- پیشنهادات اجرایی.....72
5-9- پیشنهادات پژوهشی.....73

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 3-1- مواد مصرفی مورد استفاده در تغذیه آبزیان.....19
جدول 3-2- مواد مصرفی مورد استفاده در بررسی موادغذایی و لاشه.....19
جدول 3-3- مواد مصرفی مورد استفاده در تکثیر ماهیان.....19
جدول 3-4- مواد غیر مصرفی مورد استفاده در تحقیق.....20
جدول 3-5- برنامه غذادهی از زمان لاروی تا رسیدن به مرحله تولید مثل.....21
جدول3-6- تجزیه اجزای جیره غذایی و تنظیم جیره های آزمایشی.....22
جدول 3-7- زمان‌بندی نمونه برداری.....23
جدول 4-1- تجزیه اجزای جیره های غذایی.....35
جدول 4-2- وضعیت رشد ماهی قرمز در طول دوره تغذیه با جیره‌های آزمایشی.....36
جدول 4-3- ترکیب نهایی لاشه ماهیان آزمایشی.....36
جدول 4-4- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب طی دوره پرورش.....37
جدول 4-5- مراحل رسیدگی تخمدان ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی.....39
جدول 4-6- مراحل رسیدگی بیضه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی.....45
جدول 4-7- پارامترهای کیفیت اسپرم نرهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی.....57
جدول 4-8- کیفیت سلول‌های جنسی ماده‌های تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی.....58
جدول4-9- اثر جیره‌های آزمایشی بر تولید مثل.....59

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 1-1- محور مغز- هیپوفیز- اندام جنسی (B-P-G).....2

شکل 1-2- مراحل نموی اووسیت در ماهیان استخوانی. از چپ به راست: از اووسیت اولیه تا اووسیت وتیلوژنیک و بالغ.....3

شکل 1-3- سلول‌های تولیدکننده استروئیدهای‌جنسی در ماده.....8

شکل 1-4-ساختار شیمیایی 17- بتا استرادیول و دو ایزوفلاون موجود در سویا.....12

شکل 3-1- اسپرماتوسایت‌هایی که با رنگ سبز، آبی و زرد احاطه شده‌اند به‌ترتیب محتوی اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیست و اسپرماتید هستند. پیکان مشکی اسپرماتوزوآ را نشان می‌دهد.....55

شکل 4-1- شاخص گنادوسوماتیک در نرها.....38

شکل4-2- شاخص گنادوسوماتیک در ماده‌ها.....38

شکل 4-3- تخمدان در مرحله I رسیدگی جنسی.....40

شکل 4-4- تخمدان در مرحله پیش از زرده‌سازی**(مرحله (II)**.....40

شکل 4-5- تخمدان در مرحله زرده‌سازی**(مرحله(III)**.....41

شکل4-6-تخمدان تیمار 4، پیکان اووسیت‌های آتروفی را نشان می‌دهد.....41

شکل 4-7- تخمدان در مرحله رسیدگی. 42

شکل 4-8- نسبت رسیدگی جنسی در تخمدان ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 1.....42

شکل 4-9- نسبت رسیدگی جنسی در تخمدان ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 2 42

شکل 4-10- نسبت رسیدگی جنسی در تخمدان ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 3 42

شکل 4-11- نسبت رسیدگی جنسی در تخمدان ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 4 44

شکل 4-12- یک اسپرماتوسیست.....45

شکل 4-13- افزایش اسپرماتوگونیا (پیکان سبز) در تیمار 4.....**46**

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 4-14- نسبت رسیدگی جنسی در بیضه ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 1 46

شکل 4-15- نسبت رسیدگی جنسی در بیضه ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 2.....47

شکل 4-16- نسبت رسیدگی جنسی در بیضه ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 3.....47

شکل 4-17- نسبت رسیدگی جنسی در بیضه ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی 4 48

شکل 4-18- غلظت تستوسترون در ماهیان نر.....49

شکل 4-19- غلظت تستوسترون در ماهیان ماده.....49

شکل 4-20- غلظت استرادیول در ماهیان نر.....50

شکل 4-21- غلظت استرادیول در ماهیان ماده.....51

شکل 4-22- نسبت غلظت استرادیول به تستوسترون در ماهیان نر.....51

شکل 4-23- نسبت غلظت استرادیول به تستوسترون در ماهیان ماده.....52

شکل 4-24- غلظت پروژسترون در ماهیان نر.....53

شکل 4-25- غلظت پروژسترون در ماهیان ماده.....53

شکل 4-26-غلظت آلکالین فسفاتاز در ماهیان.....54

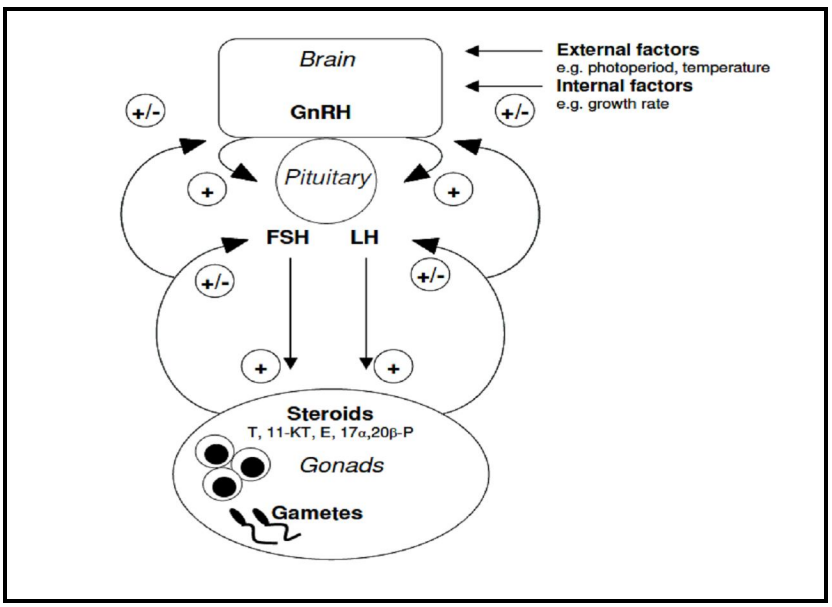
شکل 4-27- غلظت اسید فسفاتاز در ماهیان.....55

فصل اول

مقدمه و کلیات

1-کلیات

بلوغ فرایندی است که به‌موجب آن یک جانور نابالغ برای نخستین بار توانایی تولیدمثل را به‌دست می‌آورد (تارانگرو همکاران، 2009). آغاز بلوغ در ماهیان استخوانی به‌واسطه شروع فرایند تولید اسپرم در نرها (شولز و همکاران،2010) و زرده‌سازی در ماده‌ها (لوبزنز و همکاران، 2010) مشخص می‌گردد. فعالیت تولیدمثلی در ماهیان استخوانی توسط محور مغز-هیپوفیز-گناد[1] تنظیم می گردد (شکل 1-1). هورمون آزادکننده گنادوتروپین[2] که در مغز تولید شده‌است، تولید و رهاسازی گنادوتروپین‌های هیپوفیز[3] را فعال می‌سازد که خود استروئیدهای جنسی را تحریک می‌کند و باعث تولید سلول‌های جنسی شده، پسخورهای[4] منفی و مثبت را به‌طور مستقیم در سطح هیپوفیز یا از طریق مغز اعمال می‌کنند.



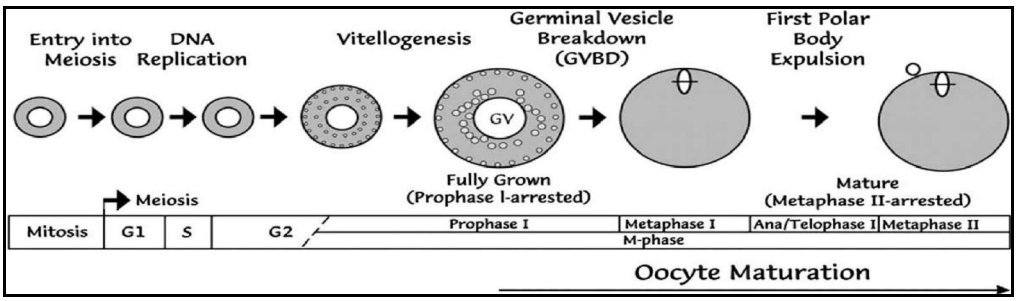
شکل 1-1، محور مغز- هیپوفیز- اندام جنسی (B-P-G) (موگارس و همکاران، 2007).

[1] Brain-Pituitary-Gonad axis
[2] Gonadotropin Releasing Hormone
[3] Gonadotropic Hormone
[4] feedbacks

1-1- تولید مثل در ماهیان استخوانی

تولید مثل شامل فرایندهای تنظیم‌شده هورمونی است، مانند رشد و بلوغ اندام‌های جنسی و سلول‌های زایشی، تولید سلول‌های زایشی عملکردی (تخمک‌ها و اسپرم‌ها) که بتوانند در لقاح شرکت کنند برای بقای یک گونه رویداد مهمی هستند (باب و لابی، 2010). بنابراین، بافت‌های تولیدمثلی بایستی در طی نمو جنینی تولید شوند، و رشد و بلوغ سلول‌های زایشی بایستی پس از بلوغ جنسی موجود عمل کند. ماهیان ممکن است راهبردهای تولیدمثلی زیادی را بکارگیری کنند که عبارتند از: زنده‌زایی (لقاح داخلی، جنین درون بدن مادر نمو می‌یابد و توسط مادر مواد مغذی جهت رشد جنین فراهم می‌گردد)، زنده تخم‌گذار (لقاح داخلی، مادر تخم‌های زرده دار می‌گذارد که این تخم‌ها تا زمان تخم‌گشایی درون لوله تخم‌بر می‌مانند)، و تخم‌گذار (لقاح خارجی، جنین خارج از بدن مادر نمو می‌یابد) (جالابرت، 2005) . در گونه‌های تخم‌گذار و زنده تخم‌گذار تمام مواد مغذی درون تخم قرار دارند که این مواد شامل پروتئین‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری برای بقا و نمو جنین تا مرحله تغذیه می‌باشند (لوبزنز و همکاران، 2010).

الگوی رشد و رسیدگی اووسیت مستقل از راهبرد تولیدمثلی گونه‌های استخوانی است (شکل1- 2). نمو اووسیت در پروفاز اول میتوز[1] متوقف شده و تا زمانی‌که رشد و رسیدگی اتفاق بیفتد غیرفعال باقی‌می‌ماند (باب و لابی، 2010).



شکل 1-2- مراحل نموی اووسیت در ماهیان استخوانی. از چپ به راست: از اووسیت اولیه تا اووسیت وتیلوژنیک و بالغ (لوبزنز و همکاران، 2010) .

[1] mitosis

شروع رشد اووسیت توسط محرک‌های خارجی مثل شدت نور (دوره نوری)، تغذیه و دمای آب القا می‌گردد که مرکز هیپوتالاموسی را جهت تولید و رهاسازی گنادوتروپین‌ها نشانه می روند، (زوهار و همکاران، 2009). محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اندام جنسی در شکل (1-1) نشان داده شده‌است. در ماهی دو نوع گنادوتروپین، FSH[1] و LH[2] تشخیص داده‌شده‌است (ایدلر و انجی، 1979؛ پلاناس و همکاران،2000). FSH به‌عنوان انتقال‌دهنده اولیه سیگنال‌ها برای شروع رشد اووسیت عمل می‌کند، درحالی‌که LH در کنترل رسیدگی اووسیت نقش دارد. FSH رشد اووسیت را از طریق القاء افزایش اندازه و تعداد سلول‌های فولیکولی احاطه کننده اووسیت اولیه و تولید استرادیول[3]، قویترین استروژن در ماهیان استخوانی، کنترل می‌کند. استروژن‌ها یکی از خانواده‌های هورمون‌های جنسی ماده هستند که تولیدمثل، نمو، تمایز ریخت شناسی[4]، رشد و متابولیسم را کنترل می‌کنند. تولید استروژن توسط دو نوع سلول انجام می‌شود. سلول‌های تکا تستوسترون را از کلسترول تولید می‌کنند و سپس تستوسترون تولید شده به سلول‌های گرانولوزا وارد می‌شوند که در آن‌جا توسط آنزیم‌های آروماتاز به استروژن تبدیل می‌شوند (لوبزنز و همکاران، 2010). استروژن تولیدشده به‌درون جریان خون ترشح می‌شود که در جریان خون به‌طور تقریبی 95% استروژن به پروتئین‌های اتصالی استروئید سرم[5] یا آلبومین‌ها متصل می‌شود که از تجزیه‌شدگی[6] استروژن قبل از ورود به سلول هدف محافظت می کند (برگ، 2003). استرادیول به شکل متصل به پروتئین‌های اتصالی استروئید سرم غیرفعال است. استروژن به سلول‌های هدف انتقال می یابد و در سلول هدف استروژن آزاد فعالیت‌های غیرژنومی را توسط گیرنده‌های غشایی اجرا می‌کند (برگ، 2003)، یا از طریق انتشار تسهیل‌شده وارد سلول هدف می‌گردد و از طریق تمایل بالای اتصال به گیرنده استروژنی[7] خاص جذب می‌گردد. گیرنده استروژنی غیر فعال به پروتئین شوک حرارتی HSP90[8] اتصال دارد و در سیتوپلاسم سلولی مکان‌یابی شده است (پرات و تافت، 1997). وقتی استروژن به گیرنده استروژنی متصل می‌شود، ترکیب HSP90 جدا می‌شود و ترکیب استرادیول-گیرنده استروژنی به‌درون هسته انتقال می-

[1] Follicle-Stimulating Hormone
[2] Luteinizing Hormone
[3] Estradiol, E2
[4] morphological differentiation
[5] serum steroid binding proteins
[6] Degradation
[7] Estrogen Receptor
[8] Heat Shock Protein

یابد. همچنین نشان داده‌شده‌است که تحریکات استروژنی تغییراتی را در ریخت‌شناسی کبد القا می‌کند، از جمله تکثیر شبکه اندوپلاسمیک خشن و دستگاه گلژی. استروژن همچنین تولید ویتلوژنین پیش‌ساز زرده-تخم، پروتئین‌های‌پوشش‌زرده و همچنین تولید و رهاسازی FSH و LH را تحریک می‌کند. کبد ماهی ماده محتوی سطح بالایی از گیرنده‌های‌استروژنی است که اجازه تولید ویتلوژنین و پروتئین‌های‌پوشش-زرده را به‌دنبال تحریک استروژنی می‌دهد. از طرفی، کبد ماهیان نر و همچنین ماده‌های نابالغ هم محتوی گیرنده‌های استروژنی و ماشین ژنتیکی تولید ویتلوژنین است و القا تولید ویتلوژنین در نرها و ماده‌های نابالغ وسیله تشخیصی فعالیت استروژنی مواد شیمیایی مشکوک به فعالیت غدد درون ریز می‌باشد (اسپانو و همکاران، 2004).

1-2- فعال‌سازی محور مغز-هیپوفیز-اندام جنسی در طی بلوغ

1-2-1- هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین‌ها

پیام‌های مربوط به عوامل داخلی و خارجی مانند دوره نوری[1] و دمای آب توسط اندام‌های حسی دریافت و در مغز تجمع می‌یابند، فرایندی که به آن انتقال داده‌ها[2] می‌گویند. سپس سیستم عصبی مرکزی اطلاعاتی را سنتز می‌کند. اگر پیام‌های ثبت شده در جهت مثبت باشد (مثلا افزایش درجه حرارت یا دوره نوری)، هیپوتالاموس تحریک به تولید و رها سازی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین می‌شود و سنتز و رهاسازی گنادوتروپین‌های هیپوفیز را تنظیم می‌کند (شکل 1-1). به‌عبارتی تنظیم ترشح گنادوتروپین‌ها به-طوراصولی وابسته به فعالیت هورمون‌های عصبی، هورمون آزادکننده گنادوتروپین ها است (زوهار و همکاران، 2009). این هورمون یک دکاپپتید[3] است و انواع مولکولی چندگانه از آن، حداقل دو شکل از GnRH، به‌همراه گیرنده‌هایشان در ماهیان استخوانی وجود دارند (لتیمونیر و همکاران،2004؛ میلار، 2005). تعداد مشخصی از سلول‌های عصبی GnRH در مغز، در نزدیکی سلول‌های هیپوفیز مکان یابی شده اند که آکسون‌هایشان در تنظیم گنادوتروپین‌ها نقش دارند و فعالیت اصلی این پپتید تحریک ترشح گنادوتروپین‌ها در هیپوفیز است.

---

[1] photoperiod
[2] transduction
[3] decapeptide

1-2-2- غده هیپوفیز

غده هیپوفیز[1] یک غده درون ریز[2] است که در یک حفره استخوانی کوچک، در پایه مغز قرار دارد و به‌عنوان یک واسطه بین سیستم عصبی مرکزی[3] و اندام هدف عمل می‌کند. هیپوفیز هورمون‌هایی را تحت کنترل سیستم عصبی مرکزی سنتز و رهاسازی می کند و در نتیجه سایر غدد درون ریز را نیز تحریک می‌کند. هیپوفیز به آدنوهیپوفیز[4] (پارس دیستالیس و پارس اینترمدیا) و نوروهیپوفیز[5] (پارس نروسا) تقسیم می‌شود. آدنوهیپوفیز محتوی سلول‌های آدنوکورتیکوپیک، پرولاکتیک، تیروتروف‌ها، سوماتوتروف‌ها و گنادوتروف‌هاست. برخلاف پستانداران، ماهیان استخوانی فاقد سیستم پورتال(باب سیاهرگی) هیپوتالاموس - هیپوفیز برای انتقال نوروپپتیدها به آدنوهیپوفیز هستند. آدنوهیپوفیز مشابه نوروهیپوفیز عصب رسانی[6] مستقیم از بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی، از جمله منطقه پری‌اپتیک، هیپوتالاموس مدیوسال، سیستم بویایی و تگمنتوم مغز میانی دریافت می‌کند (زوهار و همکاران، 2009). بر خلاف پستانداران که گنادوتروپین‌ها توسط همان سلول‌ها در هیپوفیز تولید و ترشح می‌شوند، در استخوانی‌ها هورمون تحریک‌کننده فولیکول و هورمون زرده‌ساز در انواع سلول‌های متفاوتی سنتز می‌گردد (شمیتز و همکاران، 2005).

1-2-3- گنادوتروپین‌ها

همانند پستانداران، دو گنادوتروپین هیپوفیز، هورمون تحریک‌کننده فولیکول و هورمون زرده‌ساز در استخوانی‌ها جداسازی و شناسایی شد (موگارس، 2007). گنادوتروپین‌ها گلیکوپروتئین‌های هترودایمر[7] هستند که تشکیل شده‌اند از یک زیرواحد آلفا[8] که به صورت غیر کوالانسی به یک زیرواحد بتا[9] ویژه هورمون که فعالیت زیستی هورمون را اعمال می‌کنند، متصل شده‌اند (سوآنسون و همکاران، 2003). GtHI مشابه FSH پستانداران است و تصور می شود که فعال‌سازی رشد اندام جنسی و تولید

---

[1] hypophysis
[2] endocrine gland
[3] Central Nervous System
[4] Adenohypophysis
[5] neurohypophysis
[6] Innervations
[7] heterodimeric glycoprotein
[8] α-subunit
[9] β-subunit

سلول‌های جنسی را القا می‌نمایند. GtHII مشابه LH پستاندارن است و تصور می‌شود مسوول رسیدگی اندام جنسی و تخمریزی باشد (کاواوچی و همکاران،1989).

1-2-4- استروئیدهای‌جنسی

استروئیدهای جنسی در فرایند تولید سلول‌های جنسی[1]، همچنین رفتارهای تولیدمثلی و نمو صفات ثانویه جنسی دخالت دارند (بورگ، 1994). در ماهی نر، تستوسترون (T)[2] و بخصوص 11-کتوتستوسترون (11-KT)[3] به‌عنوان آندروژنهای اصلی مورد توجه قرار گرفته اند (بورگ، 1994)، و همراه با 17آلفا،20بتا-دی هیدروکسی -4-پرگنن -3-آن (17α,20β-P)[4] در فرایند اسپرم‌سازی[5] و اسپرم‌ریزی[6] حائز اهمیت هستند (شولز و همکاران، 2010). استروژنها نقش حیاتی در نمو تخمک‌ها و تحریک سنتز زرده تخمک در ماهی ماده ایفا می‌نمایند (لوبزنز و همکاران، 2010).

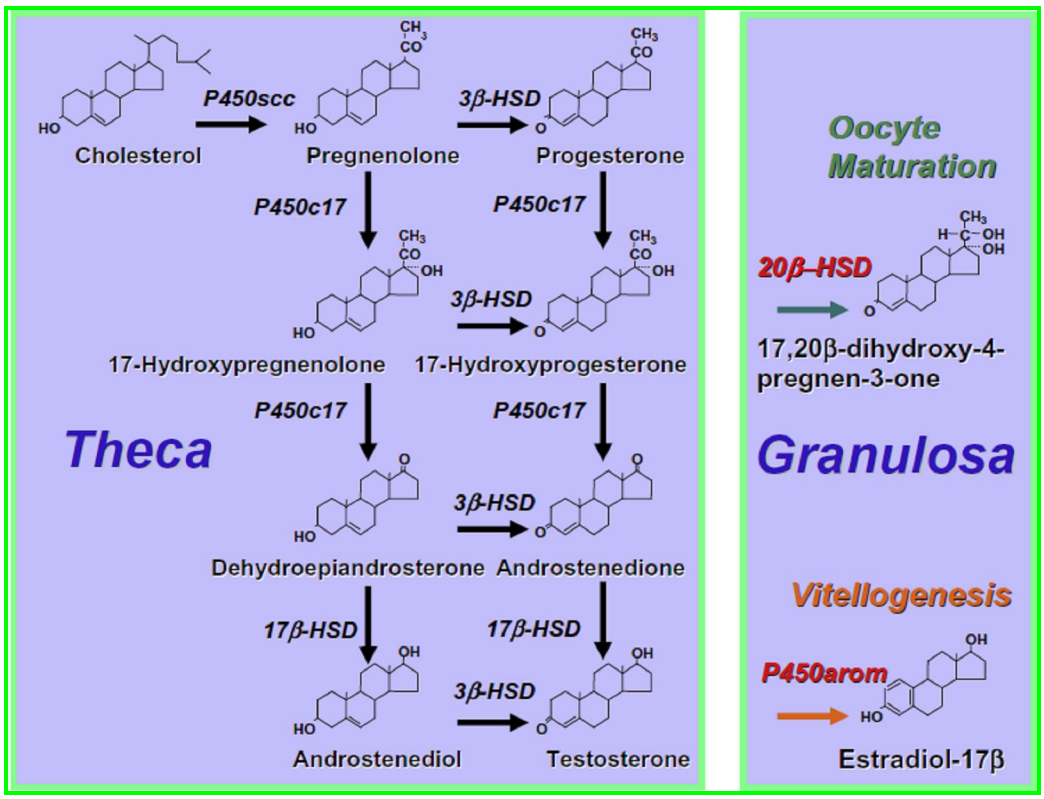
تولید استروئیدها یک فرایند پیچیده است و تولید این استروئیدها نیازمند فعالیت هم‌زمان آنزیم‌های مختلف قرار گرفته در میتوکندری یا شبکه آندوپلاسمی موجود در سلول‌های اندام جنسی (سلول‌های لایدیگ و سرتولی در نرها و فولیکول‌ها در ماده) می‌باشد (موگارس، 2007). تمام استروئیدهای جنسی از کلسترول مشتق شده اند(لوچ، 2001). استرادیول و 11-کتوتستوسترون از تستوسترون مشتق می شوند (اگرچه 11-کتوتستوسترون می تواند از آندرستندیون[7] هم تولید شود) (شکل 1-3). کلسترول خود می‌تواند یا از طریق کلسترول پلاسما برای سلول فراهم شود یا از استات توسط 3-هیدروکسی-3- متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز(HMG-CoA)[8]، که خود توسط GtH فعال می گردد، سنتز شود (لوچ، 2001).

در پستانداران، مرحله محدودکننده سرعت[9] در این فرایند انتقال کلسترول از خارج غشاء میتوکندری به داخل غشاست که بستگی به پروتئین حامل استروئید، یک پروتئین تنظیمی حاد تولید کننده استروئید

---

[1] gametogenesis
[2] testosterone
[3] 11-ketostesterone
[4] 3-one- 17 α,20 β -dihydroxy-4-pregnen
[5] spermatogenesis
[6] spermiation
[7] androstenedione
[2] Reductase 8 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
[9] rate-limiting step

(StAR)[1]، دارد (فلاک و همکاران، 2011) . درون میتوکندری، مسیر تولید استروئید با تبدیل کلسترول به پرگننولون[2] آغاز می‌شود. پرگننولون توسط آنزیم سیتوکروم P450 آنزیم شکاف زنجیره کناری کلسترول (P450scc,CYP11A) که در غشاء داخلی میتوکندری وجود دارد کاتالیز می‌شود. سپس پرگننولون توسط 3بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروکسی ژناز (3β-HSD)[3] و سیتوکروم P450 به استروئیدهای جنسی تبدیل می گردد (شکل 1-3) (لوبزنز و همکاران، 2010).



شکل 1-3- سلول‌های تولیدکننده استروئیدهای‌جنسی در ماده (برگرفته از مقاله لوبزنز و همکاران، 2010) .

[1] steroidogenic acute regulatory protein
[2] pregnenolone
[3] 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/_5-_4-isomerase

1-3- آنزیم‌های کبدی

اولین گام در تشخیص آسیب کبدی انجام آزمایش ساده خون است که حضور آنزیم های کبدی مشخص را نشان می‌دهد. تحت شرایط عادی این آنزیم‌ها درون سلول‌های کبدی وجود دارند؛ اما زمانی- که کبد آسیب می‌بیند این آنزیم‌ها وارد جریان خون می‌شوند.

1-4- مداخله‌کننده‌های غدد درون‌ریز

همان‌گونه که شرح داده شد، مکانیزم‌هایی که رشد و بلوغ اووسیت و اسپرم را کنترل می‌کنند بسیار پیچیده هستند و به‌راحتی توسط عوامل خارجی[1] همانند مواد مداخله کننده غدد درون ریز[2] تحت تاثیر قرار می‌گیرند. نگرانی در مورد کاهش اسپرم و افزایش اختلالات و ظهور نقص در اندام‌های تولیدمثلی ماهیان بر این حقیقت تاکید دارند که بسیاری از مواد در محیط‌های آبی وجود دارند که در سطح پایین‌تر از حد کشنده[3] برای ماهی‌ها مضر هستند. بیشتر این نگرانی‌ها در مورد آن‌دسته از مواد هستند که از هورمون استرادیول تقلید می‌کنند. تعداد این مواد با خواص استروژنی بسیار زیاد است، از جمله این مواد فیتواستروژن‌های موجود در مواد گیاهی بکار رفته در جیره‌های غذایی ماهی‌هاست. مطالعات مختلف نشان داده که ترکیبات طبیعی گیاهی هم می‌توانند اثرات مداخله کننده غدد درون ریز را ایفا کند. از لحاظ اقتصادی توجه و تحقیق در مورد قرار گرفتن در معرض این مواد استروژنی ضروریست چون بسیاری از مواد گیاهی در جیره غذایی جانوران به‌عنوان جایگزین پروتئین‌های جانوری هستند(گرین و کلی، 2008).

1-5- سویا[4]

از لحاظ گیاه‌شناسی سویا متعلق به راسته روساسه آ[5]، خانواده لگومینوسا[6] یا پاپیلوناسه آ[7] یا فاباسه آ[8]، زیر خانواده پاپیلیونوایده[9]، جنس گلایسین[10] است. سویا یک منبع پروتئینی است. متوسط محتوای پروتئینی

---

[1] Exogenous factors
[2] endocrine-disrupting substances (EDSs)
[3] Sub lethal
[4] soybean
[5] *Rosaceae*
[6] *Leguminosae*
[7] *Papillonaceae*
[8] *Fabaceae*
[9] *Papilionoidae*
[10] *Glycine*

سویا تقریبا 40% است. بنابراین پودرسویا از نظر پروتئین خام بالاست و نسبت اسیدهای آمینه ضروری آن بسیار مطلوب است (کارتر و هالر، 2000) و معمولا نسبت به پودر ماهی ارزان‌تر می‌باشد. از طرفی‌دیگر، محتوای اسیدآمینه‌های سولفوردار پروتئین سویا پایین است، متیونین محدودکننده‌ترین اسیدآمینه است و به‌دنبال آن سیستئین و ترئونین (متیوس-آپراشیو، 2008). اما این تفاوت چندان زیاد نیست و ارزش پروتئین سویا با پروتئین‌های حیوانی برابری می‌کنند. از این‌رو در مطالعات متعدد سویا به‌عنوان یک جایگزین پودرماهی و به‌عنوان منبع پروتئینی اصلی در غذای ماهیان مورد بررسی قرار گرفته‌است. برای مثال سهم پودرماهی در جیره‌غذایی گربه ماهی روگاهی[1]، از10-8 درصد در سال 1999 به سطح 4-3 درصد رسید و به‌جای آن پودرسویا جایگزین شد (رابینسون و لی، 1994؛ رابینسون و همکاران، 2005). اگر چه پودر-سویا نتایج امیدوارکننده‌ای را در جایگزینی کامل یا بخشی از پودرماهی در جیره‌غذایی بسیاری از گونه-های گیاهخوار و گوشتخوار آبزی نشان داد (روندالن و همکاران، 2004)، صنعت آبزی‌پروری هنوز کاملا استفاده از پودرسویا را به‌علت نگرانی از اثرات نامطلوب جیره‌های مبتنی بر پودرسویا بر سلامتی، رشد و نمو تولیدمثلی نپذیرفته‌است (انجی و همکاران، 2006). یکی از دلایل نگرانی از کاربرد پودرسویا وجود مقدار زیادی از ترکیبات فنولی[2] است که ایزوفلاون‌ها[3] نامیده می‌شوند و می‌توانند اثرات زیستی بالقوه‌ای بر روی جانوران از جمله انسان‌ها (باررت، 1996؛ فرندمن و بارون، 2001)، حیوانات پرورشی (وکلاوک-پوتوکا و همکاران، 2005) و ماهیان (ونـدن اینق و کروگداهل، 1990) بگذارند. به‌عبارتی دیگر هنوز عواقب تولیدمثلی ناشی از تداخل در عمل غدد درون‌ریز از طریق ترکیبات فنولی موجود در سویا که جزو فیتواستروژن‌ها [4]هستند در ماهی‌ها کاملا درک نشده‌است.

1-6- فیتواستروژن‌ها

فیتواستروژن‌ها موادی هستند با فعالیت استروژنی که به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارند. در واقع فیتواستروژن را می‌توان اینگونه تعریف کرد: "هر گونه مواد یامتابولیت‌های گیاهی که می‌تواند پاسخ‌های زیستی را در مهره‌داران القا نماید که فعالیت استروژن‌های درون زاد[5] را بواسطه اتصال به گیرنده تقلید می-

[1] channel catfish(*Ictalurus punctatus)*
[2] phenolic compounds
[3] Isoflavones
[4] phytoestrogens
[5] endogenous estrogens