بررسی اثر سیلی مارین و ۱۷ـ بتا استرادیول بر شاخص گنادی وتغییرات بافتی تخمک‌ها در ماهی ماده‌ی گورامی سه خال *(Trichogaster trichopterus)*

طاهره ناجی*[۱]، همایون حسین زاده صحافی[۲] و سولماز رضایی[۳]

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

۲ـ موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۵

چکیده

در این تحقیق، اثر سیلی مارین (silymarin) و ۱۷ـ بتا استرادیول (E_2) بر میزان شاخص گنادی و تغییرات بافتی تخمک‌ها در جنس ماده‌ی ماهی گورامی سه خال مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۰۰ قطعه ماهی ماده‌ی نابالغ با میانگین وزنی ۰/۵±۲/۵ گرم در ۸ گروه تیمار و۲گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. ماهیان در گروه‌های مختلف تیماری با سیلی مارین وE_2 بطورجداگانه (دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی) و نیز دو گروه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. کنترل ۱ دریافت کننده ۲۰ میکرولیتر متانول و کنترل ۲ بدون تزریق بودند. ۲۰ روز پس از پایان آزمایش بافت تخمدان ماهیان خارج و توزین گردید. سپس ساختار بافت شناسی تخمدان و میانگین شاخص گنادی آنها با گروه کنترل مقایسه گردید. بررسی حاصل از مقایسه شاخص گنادی اختلاف معنی داری را در تیمارهای ۱ و ۲ با GSI (۱/۲درصد)تیمارهای۳ و ۴ با GSI (۱/۸ درصد)، تیمار ۵ با GSI (۰/۷ درصد)، تیمار ۶ با GSI (۱/۲ درصد)، تیمارهای ۷ و ۸ با GSI (۱/۷۵ درصد) که به ترتیب دریافت کننده دوزهای ۱۰،۲۰،۳۰و۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم سیلی مارین و ۱۰،۲۰،۳۰و۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم E_2 بودند، در مقایسه با گروه شاهد با GSI (۰/۵ درصد) نشان داد ($P< ۰/۰۵$). این امر در بررسی مقاطع بافتی نیز مورد تایید قرار گرفت. نتایج بافتی حاکی از تاثیرگذاری بیشتر تیمارهای با دوز ۵۰ mg/kg سیلی مارین و ۱۷ ـ بتا استرادیول به علت شروع حرکت وزیکول زایا بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در مقایسه با سایر تیمارها و نیز گروه کنترل در ماهی گورامی سه خال ماده بود.

واژگان کلیدی

سیلی‌مارین، ۱۷ـ بتا استرادیول، ماهی گورامی سه خال، اووسیت‌ها، بافت تخمدان، شاخص گنادی.

* نگارنده و پاسخگو: tnaji2002 @gmail.com

مقدمه

امروزه هورمون‌ها بعنوان ابزاری جهت تکثیر و پرورش آبزیان به کار گرفته می‌شوند. استفاده از فیتواستروژن‌ها در رژیم غذایی آبزیان می‌تواند در رشد و نمو و تولید مثل ماهیان تاثیر داشته باشد. فیتواستروژن‌ها موارد کاربرد فراوانـی در موسسات تحقیقاتی و صنعت داروسازی دارند. لذا کسب دانش در خصوص نوسانات طبیعی هورمون‌هـای مـوثر در روند تولید مثلی در محیط‌های طبیعی، زمینه فراهم آوردن اطلاعات اولیه در باره استفاده اقتصـادی از هورمـون‌هـا را جهت تکثیر و پرورش آبزیان ایجاد می‌کند. یکی از راهکارهای دستیابی به این هدف استفاده از استروژن‌های اگـزوژن مثل فیتواستروژن‌ها می‌باشد. این روش اواخر دهه ۱۹۳۰ میلادی در استرالیا و به دنبال اثبـات نقـش اسـتروئیدهای جنسی بعنوان عوامل طبیعی القاء فرآیند تمایز جنسی ماهیان در شکل گیری ژنتیکی جنسیت متـداول گردیـد. ایـن استروئیدها با تقلید اثر استروئیدهای جنسی آندروژن، رشد گنادها را به سمت بلوغ جنسی هدایت می‌کنند (Maack & Segner ,2003). براین اساس Ishibachi و همکاران (2004) با بکارگیری رژیم‌های غـذایی حـاوی اسـتروژن‌هـای طبیعی و مصنوعی، نتایج مطلوبی را در این زمینه بدست آوردنـد. فیتـو اسـتروژن‌هـا ترکیبـات گیـاهی هسـتند کـه ساختمان آنها شبیه اسـتروژن‌هـای حیـوانی اسـت.(Clatfelter, 2006) فیتواسـتروژن‌هـا شـامل: ایزوفلاوونوئیـدهـا، لیگنان‌ها، ساپوژنین‌های استروئیدی می‌باشد (Falah Hosseini *et al*., 2004). مهم‌ترین ترکیـب عصـاره‌ی تخلـیص شده‌ی بذر گیاه خار مریم ۱/۵تا۳ درصد سیلی مارین است که از گروهی عناصر به نام فلاون لیگنان نظیر سیلی بـین A و B ایزوسیلی بین A و B، سیلی دیـانین، سـیلی کریسـتین مـی‌باشـند (Kvasnicha *et al*.,2003). سـیلی بـین موثرترین ماده‌ی موجود در سیلی مارین است (Lorenz *et al*, 1984; Tyler,1993). علاوه بر فلاون لیگنان‌هـا دارای ترکیباتی همچون اسیدهای میریستیک، پالمتیـک و اسـتیریک اسـت (Fraschini *et al*., 2004). اسـتفاده از سـیلی مارین در طب سنتی اروپا در درمان برخی از بیماری‌ها و عوارض کبدی به سال‌ها پـیش برمـی‌گـردد (Salmond *et al*., 1997). سیلی مارین و سیلی بین اثرات ضد سرطانی در سیستم عصبی، جلوگیری از مشکلات گوارشی، درمـان و جلوگیری از نوروپاتی، درمان و جلوگیری از بیماری‌هـای قلبـی ـ عروقـی، درمـان و جلـوگیری از دیابـت، محافظـت پوست،محافظت کبدی و ضد هپاتیت، اثر روی رسپتورهای استروژن، تنظیم پروسه آپوپتوز و التهـاب دارد (Kren & Walterova, 2005).

سیلی مارین باعث کاهش گرانولوماتوز قبل از تخمک‌گذاری می‌شود (Mata-Santos *et al*., 2010).

Jancer و همکاران (2007) گزارش کردند که سیلی مـارین باعـث کـاهش درصـد تولیـد Ros(رادیکـال‌هـای آزاد اکسـیژن دار) در سـلول‌هـای گرانولـوزا و افـزایش اووسـیت‌هـا در مـوش صـحرایی مـی‌گـردد. Pliskova و همکاران(2005)گزارش کردند القاء تخمک گذاری در سیلی مارین ۲۵/۸درصد، سـیلی بـین ۲۹/۸ درصـد و 100 E2 درصد است. Tinwell و همکاران (2000) گزارش کردند که سیلی مارین دارای اثر بروی رحم مـی‌باشـد، ایـن بـدین معنی است که سیلی مارین در فعالیت رسپتورهای استروژن در رحم اثر دارد. هـدف از ایـن پـژوهش بررسـی اثـرات سیلی مارین و ۱۷ـ بتا استرادیول بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها بر شاخص گنادوسوماتیک در ماهی گورامی سه خال می‌باشد. تحقیق حاضر بر مبنای استفاده از سیلی مارین و E_2 بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در جنس ماده‌ی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) به عنوان یک ماهی مقاوم و بسیار سازگار انجـام شـد. نتـایج ایـن پـژوهش می‌تواند برای صنعت شیلات و پرورش آبزیان وموسسات مطالعاتی و صنعتی در این حوزه مفید باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آبان ماه لغایت آذرماه ۱۳۸۹ در آزمایشگاه ماهی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی صورت پذیرفت. ماهی گورامی سه خال ماده نابالغ از یک گروه تکثیری با میانگین ۰/۵±۲/۵ گرم از کارگاه تکثیر و

پرورش ماهیان تزئینی واقع در آستانه اشرفیه تهیه شد. سیلی مارین مورد استفاده از شرکت گل دارو با درجه خلوص ۸۰ درصد و E_2 از شرکت داروسازی ابوریحان با درجه خلوص۸۰ درصد تهیه گردید. این ماهی در سن ۱۴ـ۱۲ هفته و طول ۷ سانتی‌متر به بلوغ جنسی می‌رسد و همچنین ماهی ماده دارای باله پشتی کوتاه و گرد و بدن کوچکتراز جنس نر است و ناحیه شکم گرد است.

پس از کلرزدایی آب آکوریوم‌ها، تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی در ۱۰ گروه مجزا و هر گروه شامل ۱۰ قطعه ماهی درهر آکواریوم رها سازی شد. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب قبل از آزمایش، در زمان آزمایش و پایان کار اندازه گیری شد و به صورت دما (۳±۲۵) درجه سانتی گراد، pH (۰/۴±۶/۴) و درجه سختی ۳۱۸ میلی گرم در لیترکلسیم کربنات ثبت گردید. قبل از انجام تزریق ماهیان به لحاظ طول و وزن بیومتری شدند. نمونه‌ها جهت سازگاری به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایش(۱۰آکواریوم به ابعاد ۳۰×۴۰×۱۰ سانتی‌متر مکعب وحجم آب ۴۰لیتر)و با طول دوره نوری ۱۲ساعت تاریکی و۱۲ساعت روشنایی و با غذای غنی شده گیاهی(Tetra vegetable)مورد تغذیه قرار گرفتند. آزمایش‌ها در مدت ۲۰روز و در ۱۰تزریق(در۳تکرار)و در ۸ گروه تیمار و۲گروه کنترل طبق جدول (۱) صورت گرفت. با توجه به وزن ماهیان ۰/۵±۲/۵ گرم دوز مورد استفاده به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محاسبه گردید(Ng *et al*., 1997).

جدول ۱ـ تیمارهای ماهی گورامی سه خال موردبررسی

گروه‌ها	ماده ی تزریقی	دوزتزریقی(mg/kg)
۱	سیلی مارین	۱۰
۲	سیلی مارین	۲۰
۳	سیلی مارین	۳۰
۴	سیلی مارین	۵۰
۵	۱۷ـ بتااسترادیول	۱۰
۶	۱۷ـ بتااسترادیول	۲۰
۷	۱۷ـ بتااسترادیول	۳۰
۸	۱۷ـ بتااسترادیول	۵۰
۹	کنترل۱ (متانول)	۲۰میکرولیتر
۱۰	کنترل۲ (شاهد)	بدون تزریق

پس از بیهوش کردن ماهی‌ها با استفاده از عصاره آویشن با نام تجاری PI_{222} (تهیه شده از شرکت پارس ایمن دارو) تزریق در عضله‌ی زیر باله پشتی صورت گرفت(Soivio *et al*.,1975). در ابتدا سیلی مارین و E_2 به طور جداگانه در متانول حل شدند. میزان تزریق در هر ماهی ۲۰ میکرولیتر و فاصله تزریقات در گروه‌های دریافت کننده سیلی مارین و E_2 به صورت یک روز در میان انجام گرفت. پس از انجام تزریق، ماهی‌ها در آکواریوم مربوط به گروه مورد نظر رها شده و هر ۲۴ ساعت یکبار بررسی شدند. در پایان روز بیستم ماهی‌ها به تعداد ۱۰ قطعه در هر تیمار بیهوش شده و طول ماهیان با استفاده از خط کش و وزن آنها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم انجام شد. سپس تخمدان ماهی‌ها با دقت خارج و توزین گردید. از هر تیمار تعدادی تخمدان بعنوان نمونه در محلول بوئن قرار داده شد. پس از طی مراحل پاساژ بافت و برش گیری با استفاده از میکروتوم دوار، برش‌هایی به مقطع ۵ میکرومتر تهیه و سپس نمونه‌ها با هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ‌آمیزی شدند(ناجی وهمکاران۱۳۸۷). جهت مطالعات

بافت شناسی تخمدان از میکروسکوپ با دوربین دیجیتال استفاده شد. شاخص گنادی (GSI) براساس فرمول زیر برای هر ماهی در هر تیمار محاسبه گردید.

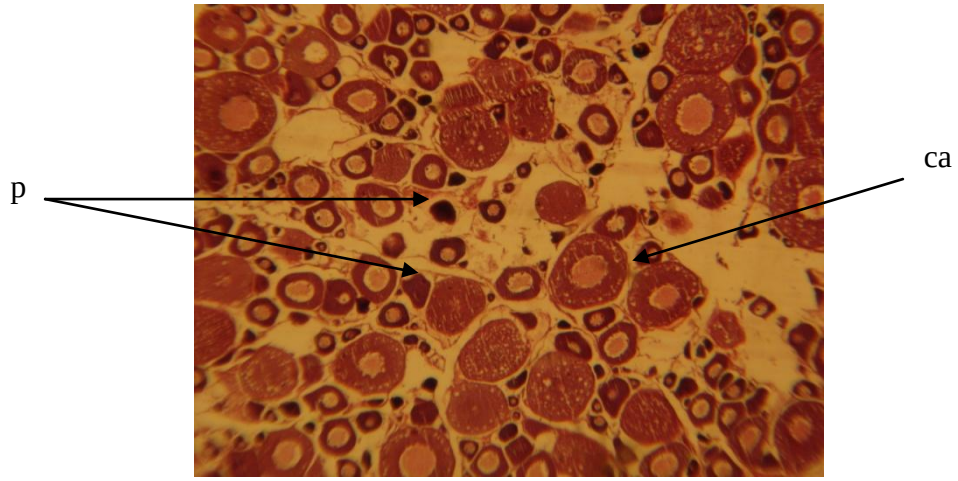
$$GSI = \frac{WG}{W} \times 100$$

در این معادله، WG وزن گناد (گرم) و W وزن کل بدن ماهی (گرم) است(Htun-Han,1979).

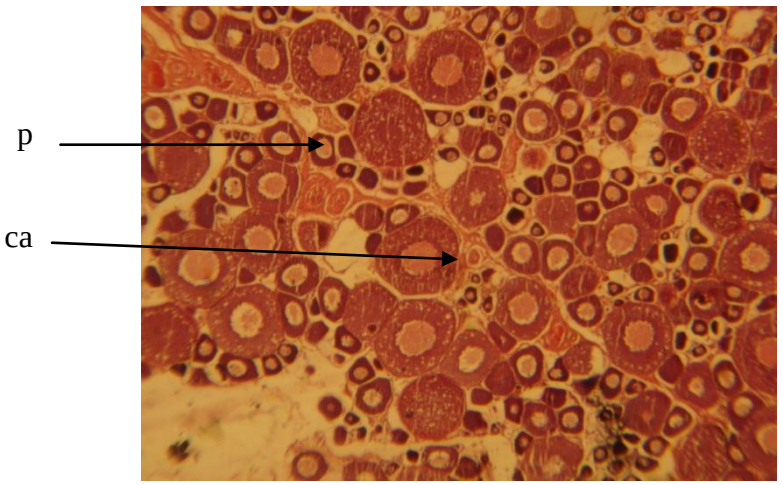
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی معنی دار بودن اختلاف مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و Duncan استفاده شد. برای ترسیم نمودار از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

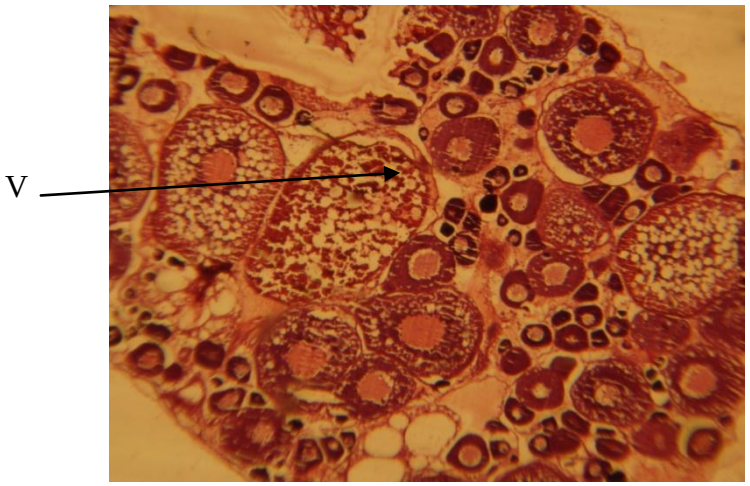
مراحل رشد و نمو اووسیت در تخمدان ماهی گورامی سه خال شامل مراحل زیر می‌باشد: مرحله ۱ هستک کروماتینی (Cn)، مرحله ۲ پیش هستک (P)، مرحله ۳ کورتیکال آلوئولی (Ca)، مرحله ۴ ویتلوژنزیس (V)، مرحله ۵ بلوغ (M)، مرحله ۶ تخم رسیده و مرحله ۷ اووسیت آترزی (A).(Degani *et al.*,1994 and Daniel&Heiko,2009) در بررسی مقاطع بافت شناسی تخمدان ماهیان گروه شاهد، بافت تخمدان شامل بافت همبند استروما و سلول‌های جنسی بود. سلول‌های جنسی غالبا شامل اووسیت‌ها در مرحله پیش هستک(*Perinucleolar stage*)بودند(شکل۱). در مقاطع بافتی حاصل از تیمار اول سیلی مارین در مقایسه با گروه شاهد تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله *Perinucleolar* کاهش یافته ذرات چربی به صورت پراکنده در اووپلاسم قابل رویت بودند (شکل۲). در مقایسه مقاطع بافتی حاصل از تیمار دوم سیلی مارین با گروه شاهد تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله‌ی پیش هستک کمتر شده و تعدادی از اووسیت‌ها نیز در مراحل ابتدایی تولید زرده *(vitellogenesis)* قرار داشتند (شکل۳). در بررسی مقاطع بافتی حاصل از تیمار سوم سیلی مارین و مقایسه آن با گروه شاهد تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله تولید زرده افزایش یافته، و تعداد اندکی از اووسیت‌ها در مرحله‌ی پیش هستک بودند. در این تیمار، شروع حرکت وزیکول زایا(*Germinal vesicle*)به سمت قطب جانوری(*Animal pole*)و اتصال ذرات چربی(*Lipid Drop fussion*)در بعضی اووسیت‌ها به یکدیگر مشاهده شد(شکل۴). در مقایسه تیمار چهارم سیلی مارین با گروه شاهد، اغلب اووسیت‌ها در مراحل انتهایی تولید زرده قرار داشتند، تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله پیش هستک به مراتب کمتر از گروه شاهد بود.در این تیمار شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری در بیشتر اووسیت‌ها و ذرات چربی در اطراف وزیکول زایا به صورت متصل به یکدیگر مشاهده شدند (شکل۵). در مقاطع بافتی حاصل از تیمار اول E_2 تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله‌ی پیش هستک کمتر و تعدادی از اووسیت‌ها نیز در مراحل ابتدایی تولید زرده قرار داشت (شکل۶) در بررسی مقاطع بافتی تیمار دوم E_2 و مقایسه با گروه شاهد، تعداد اووسیت‌های مشاهده شده در مرحله‌ی تولید زرده افزایش یافته و تعداد کمی از اووسیت‌ها در مرحله‌ی پیش هستک بودند(شکل۷). در مقایسه تیمار سوم E_2 با گروه شاهد، تعداد اندکی از اووسیت‌ها در مرحله پیش هستک بودند و اووسیت‌ها در مرحله تولید زرده به مراتب بیشتر شده، در این تیمار شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری و اتصال ذرات چربی در بعضی از اووسیت‌ها به یکدیگر بود (شکل۸).در مقایسه تیمار چهارم E_2 با گروه شاهد، تعداد اووسیت‌ها در مرحله پیش هستک به مراتب کمتر از گروه شاهد بود. اغلب اووسیت‌ها در مرحله‌ی انتهایی تولید زرده قرار داشتندو همچنین در این تیمار شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری در بیشتر اووسیت‌ها مشهود بود. ذرات چربی در اطراف وزیکول زایا به صورت متصل به یکدیگر مشاهده شدند (شکل۹).



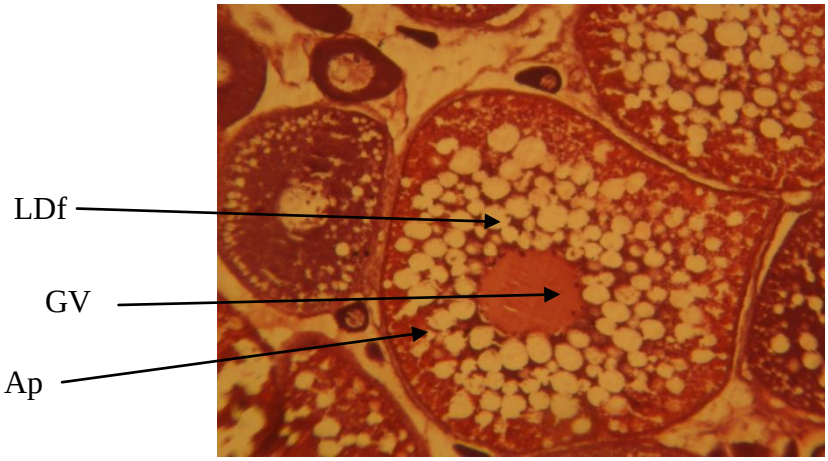
شکل ۱ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان گروه شاهد، فاز غالب اووسیت‌ها شامل مرحله پیش هستک *(P)*، *(H&E, X400)*



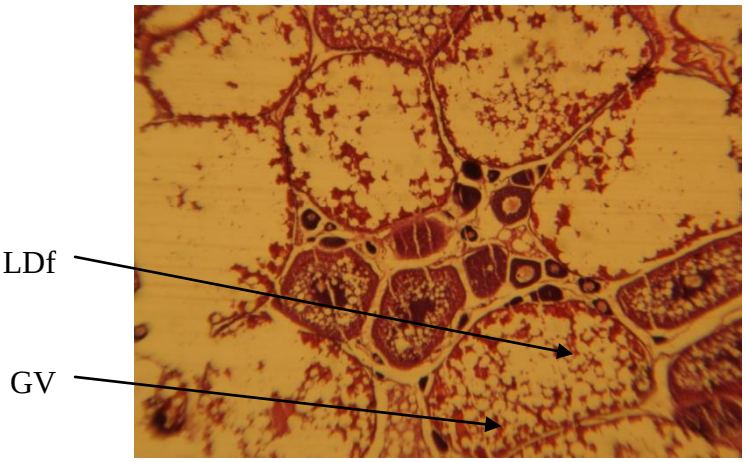
شکل۲ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار اول سیلی مارین،، ذرات چربی به صورت پراکنده، *(H&E,X400)*



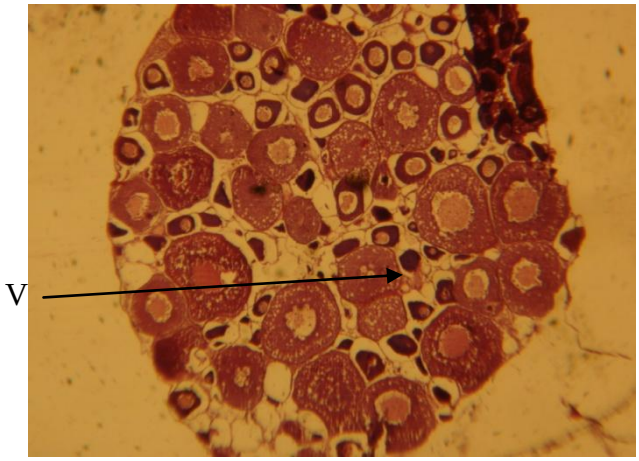
شکل۳ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیماردوم سیلی مارین، حضوراووسیت‌هایی در مراحل پری ویتلوژنز *(V)*، *(H&E,X400)*



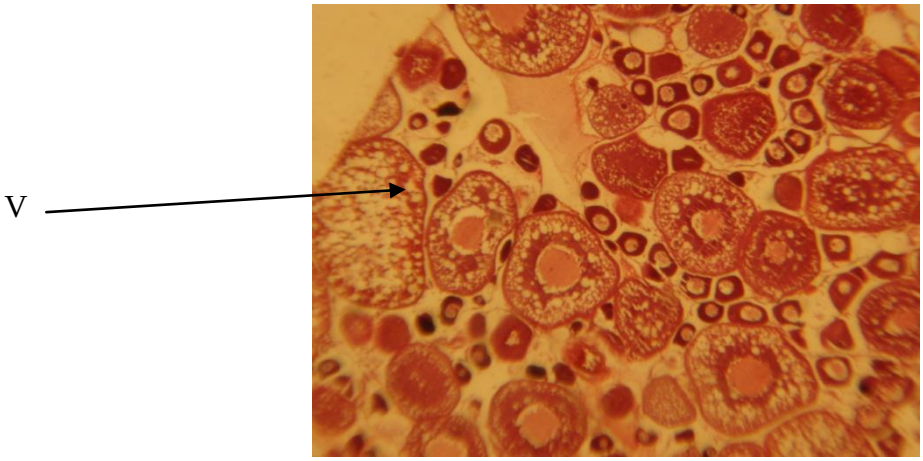
شکل۴ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار سوم سیلی مارین، شروع حرکت وزیکول زایا *(GV)* به سمت قطب جانوری(*Animal pole*)، اتصال ذرات چربی به یکدیگر *(LDf)*، *(H&E,X1000)*



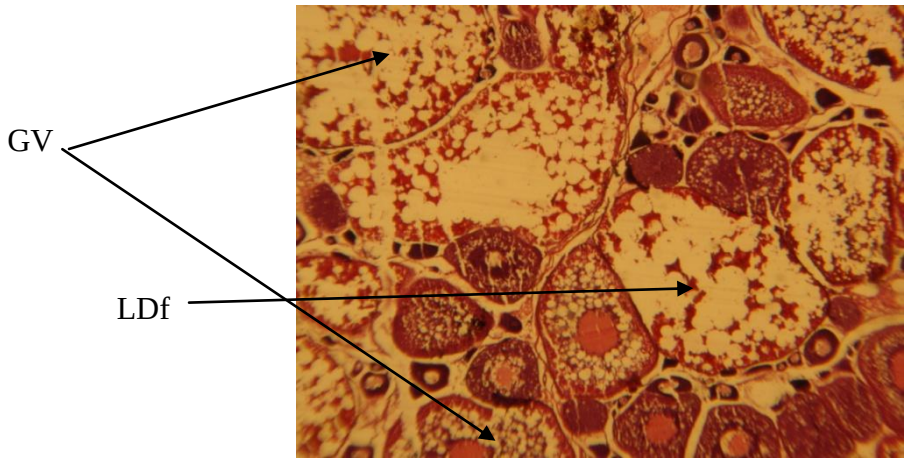
شکل ۵ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار چهارم سیلی مارین، شروع حرکت وزیکول زایا *(GV)* به سمت قطب جانوری و اتصال ذرات چربی به یکدیگر *(LDf)*، *(H&E,X400)*



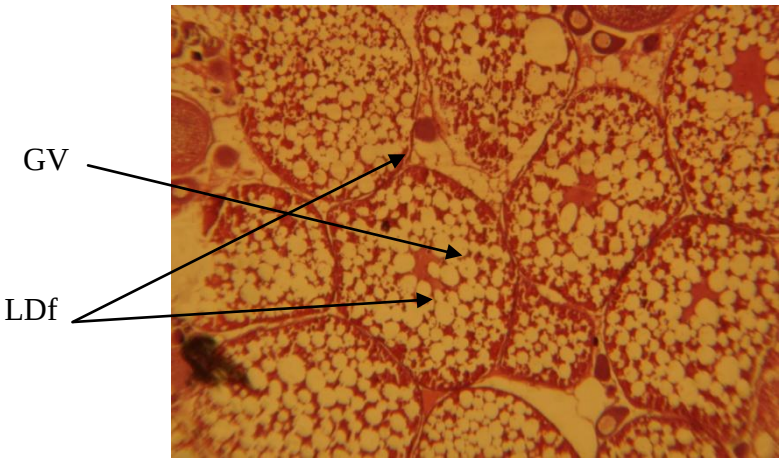
شکل ۶ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار اول *E2* حضور اووسیت‌ها در مراحل پری ویتلوژنز *(v)*، *(H&E,X400)*



شکل ۷ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار دوم *E2*، تعداد بیشتر اووسیت‌ها در مراحل ویتلوژنز *(V)* *(H&E,X400)*

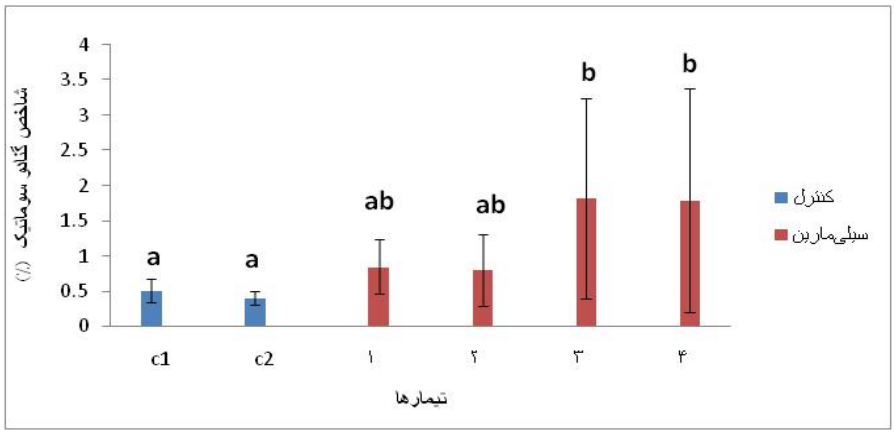


شکل ۸ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار سوم *E2*، شروع حرکت وزیکول زایا *(GV)* به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر *(LDf)* *(H&E,X400)*

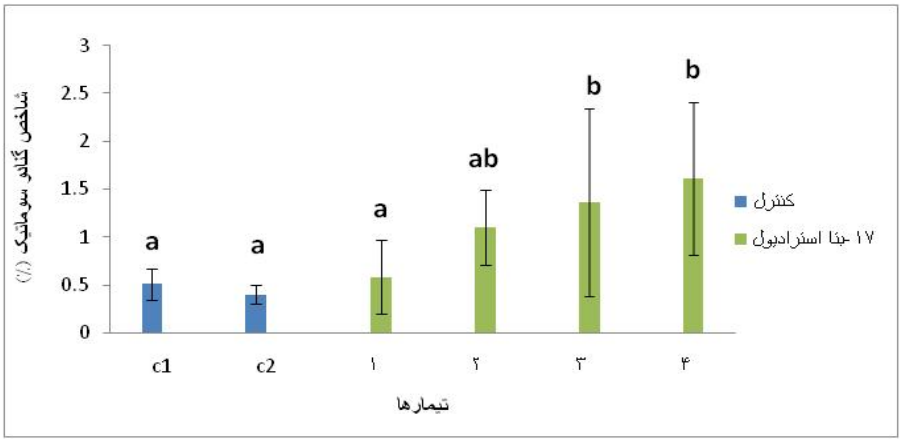


شکل ۹ـ مقطعی از بافت تخمدان ماهیان تیمار چهارم *E2*، شروع حرکت وزیکول زایا *(GV)* به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر، *(LDf)* *(H&E,X400)*

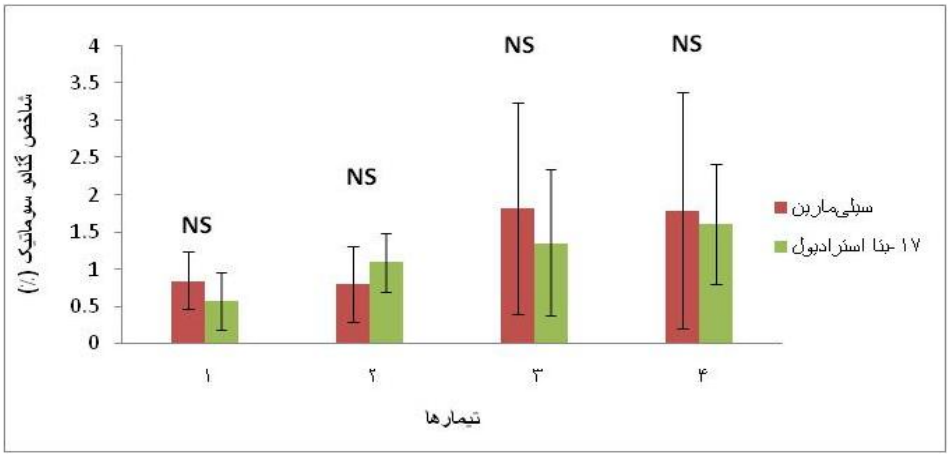
نتایج آنالیز واریا نس یک طرفه و همچنین مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن، از نظرات شـاخص گنـادی بـین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری را نشان داد.($P<0.05$)



شکل ۱۰ـ مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی بین تیمارهای مختلف سیلی مارین(حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین هر تیمار می‌باشد و آنتنک‌ها نشا نه ی انحراف معیار است)



شکل ۱۱ـ مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی بین تیمارهای مختلف E_2(حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین هر تیمار می‌باشد (آنتنک‌ها نشا نه‌ی انحراف معیار است)



شکل ۱۲ـ مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی بین تیمارهای سیلی مارین و E_2 (حروف یکسان نشانگر عدم اختلاف معنی دار بین هر تیمار است (آنتنک‌ها نشا نه‌ی انحراف معیار است)

بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین درصد شاخص‌گنادی بین تیمارهـای مختلـف و همچنـین بررسـی تغییرات بافت شناسی حاصل از گروه‌های مختلف از نظر فاز تکـاملی غالـب اووسـیت‌هـا در هـر گـروه نشـان داد کـه استفاده از سیلی مارین و E_2 می‌تواند سبب تسـریع در رشـد و رسـیدگی مـاهی گـورامی سـه خـال شـود و رشـد و رسیدگی از تیمار اول تا تیمار چهارم در سیلی مارین و تیمار پنجم تا هشتم در E_2 سیر صعودی داشته به طوری کـه در تیمار ۴ و ۸ این رشد و رسیدگی بارزتربود(شکل۱۰ و ۱۱). با توجه به اینکه تنها اختلاف موجود میان ماهیـان در طول دوره‌ی تزریق، میزان ماده‌ی تزریق شده بود و این مقدار نیز از تیمار اول تا چهارم و از تیمـار پـنجم تـا هشـتم افزایش یافته، به نظر می‌رسد که میزان رشد و رسیدگی در ارتباط با میزان ماده‌ی تزریق شده در هـر تیمـار اسـت و افزایش تدریجی آن نیز تابعی از افزایش میزان ماده‌ی تزریق شده بوده است.Hunter وDonaldson(۱۹۸۳)، بر میزان هورمون تزریقی بعنوان یکی از فاکتورهای مهم در فرآیند کنترل تمایز جنسی ماهیان بـا اسـتفاده از هورمـون تاکیـد کردند.نتایج حاصل از مقایسه کنترل‌های ۱ و۲ که به ترتیب دریافت کننده۲۰میکرولیتر متانول و بدون تزریق بودنـد، اختلاف معنی داری را از نظر شاخص گنادی نشان نداد($P \geq 0.05$).در مقایسه‌ی مقاطع بافتی نیـز تغییـر چشـمگیری حاصل نشد. این امر بیانگر بی‌تاثیر بودن ترکیب‌های به کار رفته در رشد و رسیدگی اووسیت‌ها می‌باشد.

بررسی نتایج حاصل از ۴ تیمار سیلی مارین با دوزهای ۳۰،۲۰،۱۰و۵۰ میلـی گـرم در هـر مـاهی، نشـان داد کـه گروه‌های تحت تیمار با سیلی مارین از نظر شاخص گنادی دارای اختلاف معنی دار نسبت بـه گـروه شـاهد بـوده‌انـد ($P<0.05$). این امر در بررسی مقاطع بافتی و مقایسه با گروه شاهد نیز تایید شد. این نتیجه نشان می‌دهد کـه سـیلی مارین می‌تواند به عنوان یک فیتواستروژن توانایی القای رشد و رسیدگی جنسی در ماهی گورامی را دارا باشد. نتیجـه این آزمایش با نتایج سایر مطالعات بدست آمده در القـای رسـیدگی جنسـی توسـط فیتواسـتروژن‌هـا در تعـدادی از ماهیان مطابقت دارد. گزارش‌هایی از تاثیر فیتواستروژن‌های مختلف بر رسیدگی اووسیت‌ها، اوولاسیون و تخـم ریـزی ماهیانی همچون ماهی سالمون (Hess *et al*., 2005 ; Kouki *et al*.,2003) موش صحرایی *(Ng et al*, 2005) وجـود دارد. بررسی نتایج حاصل میانگین درصد شاخص گنادی حاکی از تاثیرگذاری بیشتر سیلی مـارین و E_2 بـا دوز ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی ۳-۲ گرمی بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در مـاهی گـورامی مـی‌باشـد. بـه گونه‌ای که در بررسی مقاطع بافت حاصل از تیمارهای ۳، ۴، ۷ و ۸ شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سـمت قطـب جانوری و اتصال ذرات چربی به یکدیگر در برخی اووسیت‌ها مشهود بود در حالی که چنـین پدیـده‌ای کـه مبـین بـر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها باشد در مقاطع بافتی حاصل از تیمار ۵،۱،۲ و ۶ قابل رویت نبود. در تحقیقـی کـه توسـط Quarantelli و همکاران در سال ۲۰۰۹ در زمینه‌ی تاثیر سیلی مارین بر فعالیت تخمـدان مـرغ و تولیـد تخـم مـرغ صورت گرفته بیان گردید که سیلی مارین باعث افزایش معنی دار ($P<0.05$) از مرحله F_5 (فولیکول در مرحله ابتدائی رشد) به F_3 (فولیکول در مرحله میانی رشد) و کاهش معنی دار از مرحله F_3 به F_1 (فولیکول قبل از تخمک گـذاری) و افزایش پروژسترون از طریق رشد فولیکول و باعث تغییرات اندوکرینی می‌شود.*(Quarantelli et al., 2009)*

از سویی دیگر در تحقیقی که توسط Moosavifar و همکاران در سال ۲۰۱۰ در زمینه‌ی فولیکـوژنریس و بلـوغ و رسیدگی اووسیت‌ها در تعدادی افراد مونث صورت گرفت بیان شد که بلوغ اووسیت‌ها از مرحله اول به مرحله چهـارم در این افراد با سیلی مارین با دوز *mg/ ۳ day* ۳۰ مشاهده شد *(P<0.05)*. نتـایج حاصـل از ایـن آزمـایش بـا نتـایج حاصل از مطالعات Quarantelli و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Moosavifar و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابقت دارد.

در تحقیقی که توسط Kummer و همکاران در سال ۲۰۱۰ در زمینه اثر استروژنی سیلی مارین در مقایسه بـا E_2 در تخمدان موش صحرایی صورت گرفت افزایش شدت رسپتورهای استروژنی ورسپتورهای اسـتروژنی الفـا و افـزایش

اپی‌تلیوم لومینال و اندومترین در موش‌های تحت تیمار با سیلی مارین با دوز ۲۰*mg* و ۵۰*mg* مشاهده شد. ایـن امـر در مطالعات بافت شناسی نیز اثبات گردید.

در تحقیقی دیگر که توسط Nagla و همکاران در سال ۲۰۰۹ در زمینـه اثـرات اسـتروژنی و پیشـگیری از پـوکی استخوان با استفاده از سیلی مارین در مقایسه با اتینیل استرادیول (EE) در تخمدان موش صـحرایی صـورت گرفـت بیان شد که سیلی مارین با دوز ۱۵۰mg/kg/day سبب تحریک کم در افزایش وزن رحـم مـی‌شـود ولـی *EE* بـا دوز ۱/۲۵mg/kg/ day سبب تحریک شدید در افزایش وزن رحم می‌شود.

مقایسه میانگین درصد شاخص گنادی (GSI) بین ماهیان تحت تیمار با سیلی مـارین در مقایسـه بـا E_2 اخـتلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۱۲). این بدین معنی است که سیلی مارین به عنوان یک فیتواستروژن تاثیری مشابه به E_2 در القای رشد و رسیدگی ماهی گورامی را داراست. به طور کلی می‌توان نتیجـه گرفـت کـه اسـتفاده از سـیلی مارین با دوزهای ۱۰ـ۲۰ـ۳۰و۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی می‌تواند سبب رشد و رسیدگی اووسیت‌هـا در ماهی گورامی سه خال شود، که این تاثیر در دوز ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم بارزتر است.

گرچه تیمارهای سیلی مارین با E_2 تفاوت چشمگیری در شاخص GSI با یکدیگر نداشتند امـا در مقایسـه مقـاطع بافت شناسی و مشاهده تاثیرگذاری بیشتر E_2 می‌توان به این نتیجه رسید که سیلی مارین اثر کمتری نسـبت بـه E_2 در رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال دارد.براسـاس نتـایج بدسـت آمـده دراین تحقیق،اسـتفاده ازسیلی مارین وE_2 درپستانداران جهت القای بلوغ جنسـی،درمان نابـاروری درانسـان،دوزهای متفـاوت سـیلی مـارین جهـت القـای بلـوغ جنسـی درسـایر ماهیـان اسـتخوانی وپستانداران،بررسـی اثـرات سـیلی مـارین در مقایسـه بـا سایرفیتواستروژن‌ها در ماهی گورامی سه خال و بر میـزان هورمـون‌هـای جنسـی (اسـتروژن وپروژسـترون)پیشـنهاد می‌شود.

منابع

ناجی، ط.، نجات خواه معنوی، پ. و شیرین آبادی، م. ۱۳۸۷. نقش تیمارهای هورمونی ۱۷ـ بتا استرادیول والـرات در تمایز جنسی ماهی قزل‌آلا رنگین کمان *(on corhynchus mykiss)* مجلـه‌ی علمـی پـژوهش‌هـای علـوم و فنـون دریایی، ۲۰ (۳): ۶۵ ـ ۵۷.

Clatfelter, E. D.& Rodriguez, A.C.2006. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. Environmental Pollution, 144:833-839.

Degani, G.,Gal, E.& Vaya, J. 1994.In vitro biosynthesis of steroids in ovary of asynchronic *Trichogaster trichopterus*.Biochem.Physiol, 109:715-723.

Donaldson, E. & Hunter, G.A. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. Fish Physiology, 9: 223-291.

Falah Hosseini, H., Hemati, A.R. & Alavian, S.M.2004. A Review of herbal medicine: *Silymarin marianum*. Journal of Medicinal Plants, 3(11): 14-24.

Fraschini, F., Demartini, G. & Esposito, D. 2002. Pharmacology of Silymarin.Clin.Druy. Invest., 22:51-65.

Hess, F.G., Parent, R.A., Cox, G.E., Stevents, k.R. & Becci, P.Y. 2001. Reproduction study in rats of ginseng extract G_{115}. Food and Shemical Toxicology, 1982; 189-192.

Htun-Han, C. 1979. The reproduction biology of the Dab *Limnda limnda* in the North Sea. Gonadosomatic index, Hepatosomatic index & Condition Factor. J. Fish. Bio., 22:369-378.

Ishibachi,H., kobayashi,M., Tomiyasu,Y., miyahara,M., Tachibanu, K., Tsuchimoto,M.& Arizono, K. 2004. Development of plasma vitellogenin assay for estrogenic effects of endocrine-disrupting chemicals using ovariectomized goldfish. Journal of Health Science, 50(2): 169-173.

Jancer, N., Kopitar, A., Ihan, A., Klun, I.& Bloke, E. 2007.Effects of apotosis and reactive oxygen species production in Human granulose cells on oocyte fertilization and blastocyst development. Assisted Reproduction and Genetics, 23:91-97.

Kouki, T., Kishitake, M., Okamoto, M., Oosuka, L., Takebe, M.& Yamanouchi, k. 2003. Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. Hormones and Behavior, 2: 140-145.

Kren, V. & Walterova, D. 2005. Silybin and Silymarin and Silymarin-new effects and applications. Biomed., 149:29-41.

Kummer,V., Moskava, J., Canderle, J., Zraly, Z., Neca, J.& Machala, M. 2001. Estrogenic effects of Silymarin in ovariectomized rats. Veterinarni Medicina, 46:17-23.

Kvasnicha, F.B., Sevc̦k. R., Voldrich, M.& Krat, J. 2003. Analysis of the active components of Silymarin. Chromatograghy, 990: 239-245.

Lorenz,D.,Lucker, P.W., Menniche, W.H.& Wetzelsberger. N. 1984. Pharmacokinetic studies with Silymarin in human serum and bile.Pharmacol., 6:655-661.

Mata-Santos, H.A., Fabiana, G., Calves, L., Carneiro, Carolina.,CladiaNeto, R.,Paiva, M. T.& Santos pyrrho, A.d. 2010. Silymarin teretment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. Parasitology Reserch, 24: 1429-1434.

Maack,G.& Segner,H.2003.Morphological development of the gonads in Zebra fish. Journal of Fish Biology,4:895-906.

Moosavifar, N., Mohamadpour, A.H., Jallali, M., Karimi, G.& Saberi, T. 2010. Evaluation of effects of Silymarin on granulose cell apoptosis and follicular development in patients undergoing in vitro fertilization. Eastern Mediterranean Health Journal, 16:14-16.

Nagla, A.E., Shit, A.,Hegazy, S. & Karema, E.D. 2010. Evidences for antiosteoporitic and selective estrogen receptor modulator activity of Silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectom ized rats. Phytomedicine, 17:116-125.

Ng, Y., Han Son, S., Malisone, J.A., Wentworth, B. & Barry, T. P. 2005. Genistein and other is flavones found is soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. Aquaculture, 28: 658-665.

Pliskova, M., Vondrucek, J., Kren, V.,Gazak, R.k.,Sedmera, P., Walterova, D.,Psotova, J., Simanek, V. & Machala, M.2005. Effects of Silymarin flavonolignans and synthetic Silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation.Toxicology, 215: 80-89.

Quarantelli, A., Romanelli, S., Basini, G. & Righi, F. 2009.The effects of Silymarin on ovarian a ctivity and productivity of laying hens. Animal Science, 2:769-771.

Salmond,S. 1997. Herbal and hepatitis C. International Journal of Alternative and Complementary Medicine, 15:17-19.

Soivio, A., Nyholml, K. &Huhuti, M. 1975. Effect of anesthesia with MS222 and Benzocaine of the blood constituents of Rainbow trout. Fish Bio., 10: 91-101.

Tinwell, H., Soames, A.R., Foster, J.R. & Ashby, J.2000. Estradiol-type activity of coumestrol in mature and immature ovariectomized rat uteritropic Assay. Healt Perspect, 108: 613-634.