

## Effect of genistein on some seminal plasma biochemical and enzymes in male gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)

Elham Nezafatian<sup>1\*</sup>, Vahid Zadmajid<sup>2</sup>

1. Former M.Sc. Student, Department of Fisheries Science, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, P.O. Box 416, Sanandaj, Iran

2. Assistant Professor, Department of Fisheries Science, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, P.O. Box 416, Sanandaj, Iran

(Received: Jul. 8, 2016 - Accepted: Oct. 22, 2017)

## تأثیر جنستین بر روی برخی پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی مولدین نر ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*)

الهام نضافتیان<sup>۱\*</sup>، وحید زادمجید<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه

کردستان، سنندج

۲. استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۳۰)

### Abstract

In this study, the effects of genistein and 17 $\beta$ -estradiol (E2) was investigated on some semen seminal plasma biochemical and enzymes in male gibel carp, during the spermiation phase. Mature male gibel carp (with ~ 30 to 40 g body weight (BW)) received intramuscular injections of one of two genistein doses (5  $\mu$ g/g BW; G5, or 50  $\mu$ g/g BW; G50), (10  $\mu$ g/g BW 17 $\beta$ -estradiol, E2), 10  $\mu$ g/g BW corn oil+ DMSO. Then, milt were collected in order to measure seminal plasma ionic, nonionic compounds and enzymes. The results of this study showed, there were significant differences in seminal plasma ionic, nonionic compounds and enzymes among the treated groups ( $p < 0.05$ ). There were highest sodium, calcium and magnesium levels in G50 and E2-treated groups, respectively. The concentrations of phosphorous and creatinine were increased in the E2-treated fish, while, the values of urea and triglyceride were decreased in E2, G5 and G50-treated fish when compared to the control group. There were a significant decreases in seminal plasma ALT and AST levels in E2, G5, G50 treatments relative to the control fish ( $p < 0.05$ ). However, seminal plasma ALP was significantly increased in E2 and G5-treated fish. The results of this study emphasize to this point the amount of genestein as a phytoestrogenic compound in broodstock aquafeeds should be considered, since high doses of this estrogenic compounds will impair sperm quality by changing the seminal plasma composition.

**Keywords:** Genistein, 17 $\beta$ -estradiol, Gibel carp, Seminal plasma compositions.

### چکیده

در این مطالعه اثرات جنستین و 17 $\beta$ -استرادیول بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای سمینال ماهی قرمز در مرحله اسپرمیشن مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان مولد نر (با وزن تقریبی 30 تا 40 g) تحت تزریق داخل عضلانی 5  $\mu$ g/g (G5) و 50  $\mu$ g/g (G50)، جنستین، 10  $\mu$ g/g (E2)، 10  $\mu$ g/g (E2)، 10  $\mu$ g/g (E2) روغن ذرت + DMSO قرار گرفتند. سپس از ماهیان اسپرم‌گیری به عمل آمد و برخی ترکیبات غیرآلی، ترکیبات آلی و آنزیمی پلاسمای سمینال اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در ترکیبات غیرآلی، ترکیبات آلی و آنزیمی پلاسمای سمینال بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). بیشترین غلظت سدیم، کلسیم و منیزیم به ترتیب در تیمارهای G50 و E2 مشاهده شد. غلظت فسفر و کراتینین در تیمار E2 افزایش یافت، در صورتی که غلظت اوره و تری‌گلیسرید پلاسمای سمینال در تیمارهای E2، G5 و G50 نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. همچنین کاهش معنی‌داری در غلظت‌های ALT و AST در تیمارهای E2، G5 و G50 نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در صورتی که غلظت ALP در تیمارهای E2 و G50 به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج این پژوهش بر این نکته تأکید دارد که میزان جنستین به عنوان یک ترکیب فیتواستروژنی در جیره غذایی مولدین باید بررسی گردد چرا که حضور این ترکیبات استروژنی در دوزهای بالا، از طریق تغییر در ترکیبات پلاسمای سمینال باعث تغییر معنی‌داری در کیفیت اسپرم خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: جنستین، 17 $\beta$ -استرادیول، ماهی قرمز، پلاسمای سمینال.

## مقدمه

امروزه به طور فزاینده‌ای عملکرد تولیدمثلی ماهیان به منظور ارزیابی تأثیرات مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز<sup>۱</sup> در محیط‌های آبی و یا در جیره‌های غذایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. محققان بیان نموده‌اند که مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز بعنوان استروژن‌های خارجی زیست‌محیطی می‌توانند عملکرد استروژن‌های داخلی بدن به‌ویژه E2 را تقلید کنند (Lehtinen et al., 2001; Bjerselius et al., 1999). ملاحظات زیست-محیطی و اقتصادی باعث شده تا نیاز به استفاده از پروتئین‌های گیاهی به جای پروتئین‌های حیوانی در جیره غذایی آبزیان و دام افزایش یابد. به گونه‌ای که در حال حاضر فرآورده‌های سویا به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب تا حدی جایگزین پودر ماهی در جیره غذایی آبزیان شده‌اند (Cleveland et al., 2015). از طرفی مشخص شده است که جنسیتین (-4,5,7 trihydroxyisoflavone) به‌عنوان یک فیتواستروژن موجود در سویا نقش مختل‌کننده در عملکرد غدد درون‌ریز را بازی می‌کند و بر روی اعمال تولیدمثلی ماهیان تأثیرگذار است (Bennetau-Pelissero et al., 2001). جنسیتین که فراوان‌ترین و بیشترین فعالیت بیولوژیکی را در میان ایزوفلاون‌های سویا دارا می‌باشد و از لحاظ ساختاری مخصوصاً در حلقه فنول شباهت زیادی با استرادیول دارد که این ویژگی باعث توانایی اتصال به گیرنده‌های استروژن و پروتئین‌های گیرنده هورمون‌های جنسی می‌شود (Dixon & Ferreira., 2005). مطالعات نشان می‌دهد که جنسیتین می‌تواند عملکرد هورمون‌های درون‌زاد را با مهار آنزیم‌هایی چون آروماتاز و تیروزین کیناز مختل کند (Chen et al., 1997; Huang et al., 1999; Nagao et al., 2001). بررسی‌ها به اثبات رسیده است که جنسیتین می‌تواند سنتز ویتلوژنین را در ماهیان نر تاسماهی سبیری

*Acipenser baeri* و قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* باعث اختلال در استروئیدسازی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان *O. mykiss* شود (Bennetau-Pelissero et al., 1999; Pelissero et al., 2001). با توجه به اهمیت کیفیت اسپرم در فرایند لقاح، اما مطالعات محدودی روی تأثیرات جنسیتین در زمینه کیفیت اسپرم ماهیان انجام شده است. نتایج برخی از این مطالعات حاکی از کاهش کیفیت اسپرم در ماهیان را دارد. برای مثال Green & Kelly (2008) گزارش کردند که انکوباسیون بافت بیضه گربه ماهی *Ictalurus punctatus* و اردک ماهی *Sander vitreus* در حضور غلظت‌های مختلف جنسیتین باعث کاهش در تحرک اسپرم شد. همچنین Bennetau-Pelissero et al. (2001) گزارش کردند که تغذیه ماهیان قزل‌آلای نر به مدت ۱ سال با جیره‌های حاوی جنسیتین باعث تسریع در فرآیند اسپرماتوزن و همچنین کاهش تحرک و غلظت اسپرم در زمان تخم‌ریزی شد. در مطالعه Bagheri et al. (2013) نیز مشخص گردید که تغذیه طولانی‌مدت ماهیان قرمز از سویا (به‌عنوان یک منبع غنی فیتواستروژن‌ها) باعث کاهش کیفیت اسپرم و کاهش لقاح تخمک‌ها می‌شود. پلاسمای سمینال در بیشتر ماهیان استخوانی از اندام‌های داخلی مختلفی (مانند بیضه و اپیتلیوم مجرای اسپرم) ترشح می‌شود و نقش اصلی ترکیبات پلاسمای سمینال ایجاد یک محیط مطلوب برای ذخیره‌سازی اسپرم است (Zadmajid, 2016). کیفیت اسپرم از عواملی است که می‌تواند میزان لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای سمینال معیار مهمی برای دستیابی به کیفیت اسپرم است (Billard et al., 2011). به گونه‌ای که ترکیبات شیمیایی پلاسمای سمینال می‌توانند روی کیفیت یا توانایی لقاح اسپرم من جمله توان حرکت و قدرت نفوذ به تخمک در ماهیان تأثیرگذار باشند. عواقب تولید مثلی ناشی از تخریب عملکرد غدد درون‌ریز، که در اثر مصرف فیتواستروژن‌ها در ماهی ایجاد می‌شود، به طور کامل شناخته شده

1. Endocrine-Disrupting Substances (EDSs)

تحت پرورش در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی (12L:12D) قرار گرفتند و روزانه ماهیان به مقدار ۳ درصد وزن بدن و در دو وعده غذایی در روز با غذای مخصوص ماهی قرمز (انرژی-ساخت کشور تایلند) شامل: ۳۳/۷۱ درصد پروتئین خام، ۸/۴۱ درصد چربی خام، ۹/۲۱ درصد خاکستر و ۲/۹۲ درصد فیبر خام تغذیه شدند.

در ابتدای فصل بهار و در مرحله بلوغ رسیدگی جنسی، مولدین نر و ماده از یکدیگر جدا شدند. تشخیص مولدین نر و ماده با مشاهده علائم خارجی رسیدگی جنسی صورت گرفت. به گونه‌ای که تشخیص مولدین نر بالغ از طریق فشار به ناحیه شکمی و خارج شدن اسپرم و همچنین وجود دانه‌های زبر و مرواریدی شکل روی سرپوش آبششی و قسمت فوقانی باله سینه‌ای صورت گرفت. در صورتی که مولدین رسیده ماده واجد شکم نرم و برآمده می‌باشند. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل، مولدین نر بصورت جداگانه به ۴ تیمار (۲ تکرار برای هر تیمار و ۱۰ عدد مولد در هر تکرار) تقسیم شدند. در شروع آزمایش، جنسیتین و هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل و سپس به نسبت ۱:۳ با روغن ذرت رقیق شدند (Cleveland & Manor, 2015). در ادامه ماهیان مولد نر با ۲ دوز ۵ μg/g (G5) و ۵۰ μg/g (G50)، جنسیتین (G50)، ۱۰ هورمون ۱۷ بتا-استرادیول (گروه کنترل مثبت، E2) و گروه کنترل ۱۰ μg/g روغن ذرت + DMSO یک روز در میان به مدت ۱۰ روز قبل از اسپرم‌گیری تحت تزریق قرار گرفتند (Zhang et al., 2002; Cleveland & Manor, 2015).

#### اسپرم‌گیری

به منظور تعیین اثرات E2 و جنسیتین بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی، در روز دهم آزمایش بعد از خشک کردن منفذ تناسلی بدون

نیستند (Green & Kelly, 2008). از آنجایی که مطالعات بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای اسپرمی می‌تواند به عنوان کلیدی در دست یافتن به کیفیت اسپرم باشد، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر فیتواستروژن جنسیتین در دو دوز خوراکی (۵ μg/g) که به طور طبیعی در جیره‌هایی که نیمی از پروتئین آن حاوی پودر سویا یا کنسانتره پروتئین سویا می‌باشد، یافت می‌شود و ماهیان روزانه در تماس با آن هستند) و دارویی (۵۰ μg/g)، بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای سمینال ماهی قرمز که به عنوان یک مدل مناسب خانواده کپور ماهیان می‌باشد، انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### طراحی آزمایش

در این آزمایش ابتدا تعداد ۸۰ عدد ماهی قرمز هم اندازه با وزن تقریبی ۳۰ تا ۴۰ گرم جهت انجام مراحل آزمایش از مرکز تکثیر ماهیان زینتی در استان کردستان تهیه شد و سپس به آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه کردستان-دانشکده منابع طبیعی منتقل شدند. ماهیان پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید در تانک‌های فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری، به تعداد ۲۰ عدد در هر ونیرو (۴۰۰ لیتری، استوانه‌ای شکل و مجهز به سیستم هوادهی) معرفی شدند. آب مورد استفاده جهت نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوادهی، کلرزدایی گردید و شرایط فیزیکیوشیمیایی آب در حد بهینه برای گونه کنترل شد (درجه حرارت آب ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد؛ اکسیژن محلول ۰/۰۲±۰/۰۷ mg/L؛ نیتريت ۰/۰۱±۰/۱۲ mg/L؛ سختی کل ۱/۱۵±۱۸۴/۶ mg/L؛ پی-اچ ۳/۰±۰/۲۸). سیستم آبرسانی به تانک‌های نگهداری ماهیان متصل به آب لوله کشی شهری (شهر سنندج) بود و آب مورد استفاده قبل از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی گردید. ماهیان به مدت ۲ ماه تا زمان رسیدن بلوغ جنسی

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده در ارتباط با فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی مولدین نر پس از کنترل همگی آنها به وسیله آزمون لون، توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست توکی در سطح ۹۵ درصد ( $\alpha=0/05$ )، به عنوان POST HOC، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها و عملیات مربوط به وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد (SPSS 16, Chicago, IL). داده‌ها در نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ( $\pm$  S.E Mean) بیان شده است.

### نتایج

پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی ماهی قرمز در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

#### ترکیبات غیر آلی پلاسمای سمینال

مطابق جدول ۱، نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارهای مختلف حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار در غلظت پتاسیم و کلر پلاسمای سمینال در تمامی تیمارها بود ( $P>0/05$ ). مقایسه میانگین غلظت سایر ترکیبات غیر آلی پلاسمای سمینال در تیمارهای مختلف نشان داد که یون سدیم در تیمار E2 و G50 افزایش می‌یابد که این افزایش در تیمار G50 معنی‌دار بود ( $P<0/05$ ). نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم بیان کرد که در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P<0/05$ ). به گونه‌ای که بالاترین غلظت یون کلسیم و منیزیم به ترتیب در تیمارهای G50 و E2 مشاهده شد.

آلودگی با آب یا ادرار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شدند، با استفاده از سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Eppendorf 5810 R, Germany) شدند. بعد از سانتریفوژ، پلاسمای منی که در قسمت بالای ویال قرار دارد (سوپرناتانت) به درون ویال‌های جدید انتقال داده شد و مشخصات مربوطه به ماهی و مرحله آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شد و ویال یاد شده توسط پارافیلیم و درب پلاستیکی بسته و در دمای زیر انجماد ( $-20$  درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند (Zadmajid, 2016).

#### اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی

شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای سمینال شامل کاتیون‌های سدیم (mmol/l) و پتاسیم (mmol/l) با استفاده از کوره جذب اتمی (Jenway pfp 7, England) اندازه‌گیری و سایر ترکیبات از جمله: فسفر (mg/dl)، گلوکز (mg/dl)، اوریک اسید (mg/dl)، اوره (mg/dl)، کلسترول (mg/dl)، تری‌گلیسرید (mg/dl)، کراتینین (mg/dl)، پروتئین کل (mg/dl)، کلر (mmol/l)، کلسیم (mg/dl)، منیزیم (mg/dl) و همچنین ترکیبات آنزیمی پلاسمای سمینال آلکالین فسفاتاز (ALP; U/L)، آلانین آمینوترانس فراز (ALT; U/L) و آسپاراتات آمینوترانس فراز (AST; U/L) با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (SECOMA, NorthStar, Scientific Ltd; 229 UK) و کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (Pars Azmun Co. Ltd., Tehran, Iran) مطابق با روش کار پیشنهاد شده کارخانه مربوطه مورد سنجش قرار گرفتند.

جدول ۱. برخی از ترکیبات غیر آلی پلاسماى سمینال ماهی قرمز (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ۴ (G50)
سدیم (mmol/l)	۵۱/۴۹ $\pm$ ۳/۶۳ <sup>a</sup>	۶۶/۲۳ $\pm$ ۱/۱۸ <sup>ab</sup>	۵۲/۰۹ $\pm$ ۵/۵۷ <sup>a</sup>	۷۹/۵۹ $\pm$ ۳/۸۸ <sup>b</sup>
پتاسیم (mmol/l)	۴۳/۹۴ $\pm$ ۱/۰۷	۴۱/۴۹ $\pm$ ۱/۱۴	۴۱/۵۴ $\pm$ ۱/۴۱	۴۱/۶۶ $\pm$ ۰/۶۰
کلر (mmol/l)	۱۰۰/۰۷ $\pm$ ۱/۶۸	۹۷/۸۴ $\pm$ ۳/۱۳	۹۹/۱۳ $\pm$ ۳/۷۲	۹۶/۹۹ $\pm$ ۲/۳۳
کلسیم (mg/dl)	۵/۳۳ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>a</sup>	۴/۵۲ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۵/۴۳ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>ab</sup>	۵/۵۶ $\pm$ ۰/۲۰ <sup>b</sup>
منیزیم (mg/dl)	۱/۶۲ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۲/۵۵ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>b</sup>	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>a</sup>	۱/۹۴ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>ab</sup>

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

### ترکیبات آلی پلاسماى اسپرمی

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در میزان فسفر و کراتینین اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). به گونه‌ای که بیشترین میزان فسفر و کراتینین در تیمار E2 مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که غلظت اوره پلاسماى سمینال تحت تأثیر تیمارهای E2 و G50 کاهش معنی‌داری را نسبت به دو تیمار کنترل و G5 نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین کاهش معنی‌داری در غلظت اوره در تیمار G5 نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). مطابق جدول ۲ اختلاف معنی‌داری در غلظت تریگلیسرید پلاسماى سمینال در تیمارهای مختلف مشاهده شد. به گونه‌ای که غلظت تریگلیسرید در تیمارهای E2، G5 و G50 کاهش

معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.05$ ).

### ترکیبات آنزیمی پلاسماى سمینال

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار غلظت ALT در تیمارهای E2، G5 و G50 نسبت به گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ ). مطابق جدول ۳ اختلاف معنی‌داری در غلظت AST در بین تیمارهای مختلف مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). به گونه‌ای که کمترین غلظت AST متعلق به تیمار G5 و G50 بود. همچنین نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در میزان ALP اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). به طوری که بیشترین غلظت ALP در تیمار G50 مشاهده شد.

جدول ۲. برخی ترکیبات آلی پلاسماى سمینال ماهی قرمز (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ۴ (G50)
فسفر (mg/dl)	۱/۶۸ $\pm$ ۰/۸۶ <sup>a</sup>	۵/۰۶ $\pm$ ۰/۷۰ <sup>b</sup>	۱/۴۴ $\pm$ ۰/۲۰ <sup>a</sup>	۲/۳۱ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>a</sup>
گلوکز (mg/dl)	۱/۲۴ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>	۱/۳۵ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۲۶ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۴۵ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>
اوریک اسید (mg/dl)	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>a</sup>	۰/۶۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۰/۴۹ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۰/۴۲ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>
اوره (mg/dl)	۱۱/۱۵ $\pm$ ۰/۹۳ <sup>c</sup>	۲/۴۸ $\pm$ ۰/۵۳ <sup>a</sup>	۵/۹۵ $\pm$ ۰/۹۸ <sup>b</sup>	۲/۰۴ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>
کلسترول (mg/dl)	۶/۵۱ $\pm$ ۰/۵۵ <sup>a</sup>	۷/۰۹ $\pm$ ۱/۱۴ <sup>a</sup>	۶/۲۳ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>a</sup>	۵/۰۱ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>a</sup>
تریگلیسرید (mg/dl)	۲۲/۴۶ $\pm$ ۳/۹۲ <sup>b</sup>	۱۰/۰۳ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>a</sup>	۱۰/۵۶ $\pm$ ۰/۷۱ <sup>a</sup>	۱۳/۰۹ $\pm$ ۲/۳۳ <sup>ab</sup>
کراتینین (mg/dl)	۰/۴۷ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۰/۹۲ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>b</sup>	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۰/۶۶ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>ab</sup>
پروتئین کل (g/dl)	۰/۲۴ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۰/۳۹ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۰/۲۴ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۰/۲۳ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳. برخی ترکیبات آنزیمی پلاسما سمینال ماهی قرمز (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ۴ (G50)
(U/L) ALT	۱۶/۲۸ $\pm$ ۰/۴۱ <sup>b</sup>	۷/۲۰ $\pm$ ۱/۱۳ <sup>ab</sup>	۴/۲۳ $\pm$ ۰/۴۱ <sup>a</sup>	۶/۸۳ $\pm$ ۱/۳۱ <sup>a</sup>
(U/L) AST	۶۹/۵۹ $\pm$ ۶/۸۷ <sup>c</sup>	۳۷/۲۷ $\pm$ ۳/۹۷ <sup>b</sup>	۱۹/۴۴ $\pm$ ۰/۹۶ <sup>a</sup>	۲۸/۹۰ $\pm$ ۱/۳۴ <sup>ab</sup>
(U/L) ALP	۱۲/۳۱ $\pm$ ۰/۵۴ <sup>a</sup>	۳۷/۵۳ $\pm$ ۱/۷۹ <sup>b</sup>	۱۰/۴۱ $\pm$ ۱/۵۷ <sup>a</sup>	۴۲/۲۱ $\pm$ ۱/۳۷ <sup>b</sup>

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

سمن<sup>۱</sup> یا میلث از اسپرماتوزوآ و پلاسما سمینال تشکیل شده است. پلاسما سمینال حاوی ترکیباتی است که بعضی از این ترکیبات از اسپرماتوزوآ نگهداری می‌کنند و بعضی دیگر رابط بین سیستم تولیدمثل و اسپرماتوزوآ می‌باشند (Ciereszko *et al.*, 2000). از آنجاکه توانایی اسپرم برای لقاح تخم و پس از آن رشد و نمو طبیعی جنین به عنوان کیفیت اسپرم تعریف می‌شود (Bobe & Labbé, 2010). ارزیابی سریع کیفیت اسپرم و دست یافتن به دانش ترکیب پلاسما سمینال می‌تواند انتخاب مولد مناسب را برای به‌دست آوردن اسپرم با کیفیت بهتر آسان نماید (Rurangwa *et al.*, 2004). مطالعات روی خصوصیات سمن به‌منظور فهم فرآیندهای بیوشیمیایی که در حرکت اسپرم (Coward *et al.*, 2002; Ingerman *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2003; Kowalski *et al.*, 2003) و همچنین توانایی لقاح تولیدمثلی گونه‌های مختلف ماهیان (Coward *et al.*, 2002; Rurangwa *et al.*, 2004; Alavi *et al.*, 2005) و بهبود روش‌های نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت اسپرم (Piros *et al.*, 2002) صورت می‌گیرد. پلاسما سمینال ماهیان حاوی یون‌های مختلفی چون  $K^+$ ،  $Na^+$ ،  $Cl^-$ ،  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  می‌باشد (Mylonas *et al.*, 2016) محققان نشان داده‌اند که روابط آشکاری بین پلاسما سمینال، اسمولاریته و مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان وجود دارد (Alavi & Cosson, 2005)، به گونه‌ای که تعادل یونی در

پلاسما سمینال برای بلوغ اسپرم، بی‌تحرک نگه‌داشتن آن در بیضه‌ها و مجرای اسپرم‌بر و حفظ تحرک کافی در زمان ورود به آب حائز اهمیت است (Morisawa *et al.*, 1983). در بررسی‌ها ثابت شده است که یون‌های سدیم، پتاسیم و کلراید در برقراری تعادل اسموتیکی اسپرم نقش دارند (Verma *et al.*, 2009). به گفته‌ی محققان  $Ca^{2+}$  و  $K^+$  یون‌های اصلی درگیر در فعالسازی تحرک اسپرم ماهی‌های دریایی هستند (Cosson *et al.*, 2008; Morisawa, 2008; Pérez *et al.*, 2016). با این وجود هنوز مکانیسم دقیق و اصلی وقوع این وقایع کشف نشده است (Mylonas *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر مشخص شد که غلظت یون پتاسیم پلاسما سمینال تحت تأثیر تیمارهای مختلف قرار نمی‌گیرد اما غلظت یون سدیم در تیمار G50 افزایش معنی‌داری را نشان داد. Secer *et al.* (2004) نشان دادند که بین درصد اسپرم‌های متحرک با یون‌های سدیم و پتاسیم ارتباط مستقیمی وجود دارد به طوری که پایین بودن غلظت‌های سدیم و پتاسیم باعث کاهش درصد اسپرم‌های متحرک و در نتیجه کاهش کیفیت اسپرم می‌شود. Morisawa *et al.* (1983) نیز به این موضوع تأکید کردند که یون‌های پتاسیم سرعت حرکت اسپرم را در کپور معمولی *Cyprinus carpio* افزایش می‌دهد. همچنین در تحقیقات ثابت شده است که بالا بودن درصد اسپرم‌های متحرک ماهی قرمز *C. auratus gibelio* در نتیجه بالا بودن یون‌های سدیم و پتاسیم می‌باشد که می‌تواند نشان‌دهنده کیفیت بالای اسپرم باشد (Zadmajid & Imanpoor, 2005).

در لیتر برسد تأثیر منفی بر روی تحرک اسپرم خواهد داشت. همچنین نتایج یک تحقیق که به بررسی تأثیر هورمون اووفاکت (GnRH $\alpha$ ) بر خصوصیات زیست‌شناسی پلاسما سمینال ماهی قرمز *C. auratus* *gibelio* پرداخته شده بود نشان داد که pH پایین و منیزیم بالا در ماهی چهاردم دم چادری باعث کاهش طول دوره تحرک نسبت به سایر زیرگونه‌ها شد (Zadmajid et al., 2008). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سطح منیزیم پلاسمای سمینال در تیمارهای E2 و G50 افزایش یافت، که این افزایش در تیمار E2 معنی‌دار بوده است و احتمالاً می‌تواند به عنوان یک عامل منفی در کاهش طول دوره تحرک اسپرم قلمداد گردد. مطالعات انجام شده در مورد ترکیبات آلی پلاسما اسپرمی محدود می‌باشند اما همین اطلاعات محدود نشان می‌دهند که کلسترول و پروتئین دارای نقش حفاظتی در اسپرم بوده، بخصوص در زمان تغییرات دمایی و زمانی که اسپرم از مجرای اسپرم بر وارد محیط بیرونی می‌شود (Secer et al., 2004). پروتئین‌ها به عنوان عاملی در تنظیم اسپرماتوژنز، تحرک اسپرم، حفظ ثبات غشاء لیپیدی اسپرم و محافظ آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کنند. این نتایج می‌تواند نقش منحصر به فرد پروتئین پلاسمای سمینال ماهی را به عنوان یک نشانگر کیفیت اسپرم بیان کند (Shaliutina-Kolešová et al., 2016). در مطالعات اخیر نیز اهمیت پروتئین‌های پلاسمای سمینال و ارتباط آن‌ها با کیفیت اسپرم ماهیان به اثبات رسیده است (Mylonas et al., 2016). به عنوان مثال در ماهی سوف حاجی طرخان<sup>۱</sup> (*Perca fluviatilis*) مشخص شده که پلاسمای سمینال این ماهی حاوی پروتئین‌هایی است که در تبادلات غشاء اسپرم، سازماندهی و تحرک اسپرماتوزوآ و همچنین فعالیت آنزیم‌های اکسیدوردکتاز<sup>۲</sup> دخالت می‌کنند

پتاسیم به عنوان یک عامل مهارکننده در تحرک اسپرم آزادماهیان شناخته شده است (Judycka et al., 2016). بررسی‌ها نشان می‌دهند که یون‌های سدیم، کلسیم و منیزیم اثر بازدارندگی پتاسیم در تحرک اسپرم ماهیان خاویاری و آزادماهیان را خنثی می‌کنند (Morisawa et al., 1983). یون کلسیم خارج سلولی شرط لازم برای شروع حرکت اسپرم زنده در کپور ماهیان است (Krasznai et al., 2000). در یک بررسی برای اولین بار توسط دستگاه فلوسیتومتر (جریان سیتومتری) مشخص شد که سطح  $Ca^{2+}$  و  $K^{+}$  درون سلولی با فعال شدن تحرک اسپرم در مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*) افزایش می‌یابد (Gallego et al., 2014). از این‌رو، به نظر می‌رسد نوسانات داخلی  $Ca^{2+}$  و  $K^{+}$  پلاسمای سمینال به علت مشارکت و دخالت آن‌ها در آغاز تحرک اسپرم مارماهی اروپایی است (Pérez et al., 2016). محققان بیان کرده‌اند که غلظت‌های یونی پلاسمای سمینال کپور معمولی *C. carpio* وابسته به دوره تخم‌ریزی است (Alavi & Cosson, 2006). در یک بررسی نشان داده شد که میزان یون کلسیم در پلاسمای سمینال ماهی کپور معمولی، قبل از شروع فصل تکثیر به تدریج افزایش می‌یابد تا به اوج خود در زمان یک یا دو ماه پیش از فصل تکثیر برسد و سپس طی فصل تکثیر و بعد از آن از میزان آن کاسته می‌شود (Kruger et al., 2006). در مطالعه حاضر نشان داده شد که میزان یون کلسیم پلاسمای سمینال تحت تأثیر تیمار G50 افزایش معنی‌داری می‌یابد. از آنجایی که زمان انجام این تحقیق مصادف با زمان تولیدمثل ماهی قرمز بود، شاید بتوان افزایش در سطح کلسیم پلاسما سمینال را نشان‌دهنده ایجاد یک اختلال بر میزان کلسیم در اثر تماس ماهی با دوز ۵۰  $\mu\text{g/g}$  جنس‌تئین دانست.

Alavi & Cosson (2005) به نقش منیزیم در پلاسمای سمینال ماهیان خاویاری پرداختند و ثابت کردند زمانی که غلظت یون منیزیم به ۱۵ میلی‌مول

1. Eurasian perch  
2. Oxido-reductase

نشده‌اند. هرچند مطالعات محدودی که در این زمینه انجام شده نشان می‌دهد که آنزیم‌های پلاسما سمینال دارای نقش کلیدی در متابولیسم اسپرم هستند و می‌توانند بر حرکت اسپرم تأثیرگذار باشند (Aramli *et al.*, 2013). به گونه‌ای که نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که آلکالین فسفاتاز (ALP) می‌تواند با شکستن گروه‌های فسفات انرژی لازم برای حرکت اسپرم را تامین نماید. نقش آنزیم‌هایی از قبیل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در انتقال گروه‌های آمینی بین اسیدهای آمینه با اسیدهای کتونی ثابت شده است. این آنزیم‌ها با انتقال گروه آمینی باعث تولید اسیدهای آمینه جدید می‌شوند. این اسیدهای آمینه می‌توانند نقش‌های مختلفی برای اسپرم از قبیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشند و در هنگام نگهداری کوتاه مدت یا بلند مدت اسپرم موجب حفاظت اسپرم در برابر شوک‌های اکسیداتیو شوند (Cirezko *et al.*, 1993). Gabriel *et al.* (2012) طی یک آزمایش، گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias Gariepinus*) را به مدت ۱۰ روز در معرض دوزهای مختلفی از cypermethrin (یک مخمل‌کننده غدد درون‌ریز) قرار دادند و نتایج حاکی از کاهش سطح ALT، AST و ALP در اغلب بافت‌های مورد آزمایش بود. محققین نشان دادند که کاهش فعالیت ALT، AST و ALP نسبت به گروه کنترل باعث می‌شود که انتقال عامل آمینی و عملکرد اکسیداتیو در آن‌ها غیر فعال شود. از طرفی دیگر Cirezko *et al.* (1993) نیز بیان کرده‌اند که رابطه معنی‌داری بین سطح فعالیت آنزیم AST در اسپرم تازه با درصد تخم‌گذاری ماهی وجود دارد. در مطالعه حاضر مشخص شد که میزان آنزیم‌های ALT و AST پلاسما سمینال در تیمارهای E2 و جنس‌تین کاهش معنی‌داری می‌یابد و سطح هورمون ALP در تیمار E2 و G50 افزایش معنی‌داری را نسبت به دو تیمار دیگر نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از آن است که سطح طبیعی آنزیم‌ها پلاسما سمینال

(Shaliutina *et al.*, 2012). نتایج بررسی‌ها، وجود همبستگی پائین بین کلسترول پلاسما سمینال و طول دوره تحرک اسپرم در ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان *O. mykiss* (Secer *et al.*, 2004) را نشان داده‌اند. در مطالعه حاضر مشخص شد که تیمارهای مختلف مورد آزمایش تأثیر معنی‌داری بر روی غلظت کلسترول و پروتئین کل پلاسما سمینال ایجاد نمی‌کنند.

وجود گلوکز در پلاسما سمینال ماهیان به عنوان منبع انرژی در طی تولید اسپرماتوزوآ نقش داشته (Soengas *et al.*, 1993) و به‌عنوان یک حمایت کننده خارجی از غشا اسپرماتوزوآ حمایت می‌کند (Bjerselius *et al.*, 1995). مطالعات محققین بر روی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان *O. mykiss* نشان می‌دهد که همبستگی مثبتی بین گلوکز و طول دوره تحرک اسپرم وجود دارد (Secer *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر ثابت شد که تیمارهای جنس‌تین و E2 بر روی گلوکز پلاسما سمینال ماهی قرمز تأثیری نمی‌گذارند. Secer *et al.* (2004) گزارش کردند که همبستگی معنی‌داری بین سطوحی از پروتئین با یون‌های پتاسیم و کلسیم وجود دارد که به‌طور قابل توجهی بر حرکت اسپرم تأثیرگذار است و همبستگی مثبت کمی بین این پارامترها مشاهده شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح پروتئین کل پلاسما سمینال در اثر تماس با جنس‌تین و یا E2 تغییر نمی‌کند. از آنجایی‌که اطلاعات در رابطه با نقش بسیاری از ترکیبات آلی موجود در پلاسما سمینال ماهیان محدود می‌باشد اما ثابت شده است که ترکیبات آلی در فعالیت‌های متابولیسمی اسپرماتوزوآ دخالت می‌کنند (Rurangwa *et al.*, 2004). تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تعدادی از ترکیبات آلی پلاسما سمینال مانند اوره، تری‌گلیسرید و کراتینین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر جنس‌تین و یا E2 قرار می‌گیرند و موجب تغییر در سطح طبیعی آن‌ها می‌شوند. مطالعات در زمینه سیستم‌های آنزیمی ماهیان به خوبی آنچه که در پستانداران مشخص شده، شناخته



با میزان دوزی از جنس‌تئین که در جیره‌های مصرفی آنها (۵ میکروگرم بر گرم جنس‌تئین) وجود دارد نتوانست بر روی ترکیبات آلی و معدنی پلاسمای سمینال ماهیان (بجز اوره و تریگلیسرید) تأثیرگذار باشد. از طرفی محققان بیان کردند که میزان تأثیرگذاری جنس‌تئین می‌تواند وابسته به میزان دوز در تماس، روش مورد استفاده در آزمایش (از طریق آب، جیره و یا تزریق) و گونه مورد آزمایش باشد (Latonnelle et al., 2000; Zhang et al., 2002).

#### نتیجه‌گیری

نتایج حاضر نشان می‌دهد که میزان دوز جنس‌تئینی که در جیره‌های غذایی ماهیان وجود دارد نمی‌تواند بر کیفیت اسپرم ماهی قرمز از طریق تأثیر بر شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای سمینال تأثیرگذار باشد هرچند نباید تأثیرات ایجاد شده بر شاخص‌های آنزیمی را نادیده گرفت و باید مطالعات بیشتری در زمینه ارتباط بین تأثیرات جنس‌تئین، شاخص‌های آنزیمی و کیفیت اسپرم انجام گیرد تا بتواند در بهبودی روش‌های نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت اسپرم و افزایش کارایی لقاح مصنوعی در ماهیان کمک کند. همچنین مطالعه حاضر بر این نکته تأکید دارد که باید از عدم وجود غلظت‌های بالای ترکیبات استروژنی در جیره‌های غذایی ماهی به منظور حفظ کیفیت اسپرم و موفقیت در تولید مثل اطمینان حاصل نمود.

#### REFERENCES

Alavi, SMH.; Cosson, J.; (2005). Sperm motility in fishes: Effects of temperature and pH: a review. Cell biology international; 29: 101-110.  
Alavi, SMH.; Cosson, J.; (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolarity: a review. Cell Biology International; 30: 1-14  
Aramli, MS.; Nazari, RM.; Kalbassi, MR.; Aramli, S.; (2013). Semen of Beluga, *Huso huso*: Ionic content and

توسط تماس با جنس‌تئین تغییر می‌یابد و می‌تواند موجب اختلال در عملکرد طبیعی آن‌ها شود.

در مطالعات مشخص شده که ترشح هورمون ۱۷ آلفا-۲۰ بتا- دی هیدروکسی پروژسترون بصورت معنی‌داری باعث تغییر در ترکیبات اسپرم ماهی قرمز می‌شود (Zheng et al., 1997). همچنین افزایش غلظت هورمون‌های آندروژن در نتیجه تزریق هورمون GnRHa باعث تغییر در ترکیبات اسپرم در ماهی کفشک زرد باله *Pleuronectes ferrugineus* شده است (Clearwater & Crim, 1998). نتایج مطالعه از Zadmajid et al. (2008) نشان داد که استفاده از هورمون‌های گنادوتروپین باعث تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای سمینال ماهی قرمز *C. auratus gibelio* می‌شود. از آنجاییکه جنس‌تئین به عنوان یک مختل‌کننده غدد درون‌ریز در مهار آنزیم‌های استروئیدسازی چون ۳بتا-هیدروکسی دهیدروژناز (3β-HSD) و ۱۷بتا-هیدروکسی دهیدروژناز (17β-HSD) دخالت می‌کند (Le Bail et al., 2000) و با عملکرد شبه استروژنی خود قادر به تغییر سطح استروژن‌ها و آندروژن‌های پلازما خون می‌شود، ممکن است بتواند بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی پلازما سمینال نیز تأثیر بگذارد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر هرچند که در تیمارهای E2 و G50 اختلالاتی در میزان برخی از ترکیبات آلی و معدنی پلازما سمینال مشاهده شد اما تماس ماهیان

osmolality of seminal plasma and their physiological correlation with sperm motility indices. Fisheries and Aquaculture Journal; 4: 1.  
Bagheri, T.; Imanpoor, MR.; Jafari, V.; Bennetau-Pelissero, C.; (2013). Reproductive impairment and endocrine disruption in goldfish by feeding diets containing soybean meal. Animal Reproduction Science; 139: 136-144.  
Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B.;

- Bennetau, B.; Corraze, G.; Le Menn, F.; Davail-Cuisset, B.; et al.; (2001). Effect of genistein enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*; 121: 173-187.
- Bennetau- Pelissero, C.; Bennetau, B.; Babin, P.; Le Menn, F.; Dunogues, J.; (1991). The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 38: 292-299.
- Billard, R.; Cosson, J.; Perchee, G.; Linhart, O.; (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*; 129: 95-112.
- Bjerselius, R.; Lundstedt-Enkel, K.; Olsen, H.; Mayer, I.; Dimberg, K.; (2001). Male goldfish reproductive behavior and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol. *Aquatic Toxicology*; 53: 139-152.
- Bjerselius, R.; Olsen, KH.; Zheng, W.; (1995). Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp *Carassius carassius* to the hormonal pheromone 17, 20- dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Chemical Senses*; 20: 221-230.
- Bobé, L.; Labbé, C.; (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*; 165: 535-548.
- Chen, S.; Kao, YC.; Laughton, CA.; (1997). Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 61:107-115.
- Ciereszko, A.; Glogowski, J.; Dabrowski, K.; (2000). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes. In: Tiersch, TR.; Mazik, PM.; editors. *Cryopreservation in aquatic species*. Louisiana: WAS, Baton Rouge; p: 20-48.
- Cirezko, A.; Ramseyer, L.; Dabrowski, K.; (1993). Cryopreservation of yellow perch semen. *The Progressive Fish-Culturist*; 55: 261-264.
- Cosson, J.; Groison, AL.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Dreanno, C.; Billard, R.; (2008). Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *Journal of Applied Ichthyology*; 24: 460-486.
- Clearwater, SJ.; Crim, LW.; Gonadotropin releasing hormone analogue treatment increased sperm production in yellowtail flounder *pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry*; 19: 349-357.
- Cleveland, BM.; Manor, ML.; (2015). Effects of phytoestrogens on growth-related and lipogenic genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology; Part C*; 170: 28-37.
- Coward, A.; Bromage, NR.; Hibbitt, O.; Parrington, J.; Gametogenesis, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in fish Biology and fisheries*; 12: 33-58.
- Dixon, RA.; Ferreira, D.; (2002). Genistein. *Phytochemistry*; 60: 205-211.
- Gabriel, UU.; Akinrotimi, OA.; Ariweriokuma, VS.; (2012). Changes in Metabolic Enzymes Activities in Selected Organs and Tissue of *Clarias Gariepinus* Exposed to Cypermethrin. *Journal of Environmental Science and Engineering Technology*; 1: 2.
- Gallego, V.; Martínez-Pastor, F.; Mazzeo, I.; Peñaranda, DS.; Herráez, MP.; Asturiano, J.F.; Pérez, L.; (2014). Intracellular changes in Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and pH after sperm motility activation in the European eel (*Anguilla anguilla*): preliminary results. *Aquaculture*; 418-419: 155-158.
- Green, CC.; Kelly, AM.; (2008). Effect of the exogenous soyabean phytoestrogen genistein on sperm quality, ATP content and fertilization rates in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) and

- walleye *Sander vitreus* (Mitchill). *Journal of Fish Biology*; 72: 2485-2499.
- Huang, RQ.; Fang, MJ.; Dillon, GH.; (1999). The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors. *Molecular Brain Research*; 67: 177-183.
- Ingerman, R.; Holcomb, M.; Robinson, ML.; Cloud, JC.; (2002). Carbon dioxide and pH effect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Experimental Biology*; 205: 2885-2890.
- Itoh, A.; Inaba, K.; Ohtake, H.; Fujinoki, M.; Morisawa, M.; (2003). Characterization of Camp-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research communication*; 305: 855-861.
- Judycka, S.; Nynca, J.; Liszewska, E.; Dobosz, S.; Zalewski, T.; Ciereszko, A.; (2016). Potassium ions in extender differentially influence the post-thaw sperm motility of salmonid fish. *Cryobiology*; xxx: 1-9.
- Kowalski, R.; Wojtczak, M.; Glogowski, J.; Ciereszko, A.; (2003). Gelatinolytic and antitrypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. *Aquatic Living Resources*; 16: 438-444.
- Krasznai, Z.; Marian, T.; Izumi, H.; Damjanovich, S.; Balkay, L.; Trón, L.; et al.; (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels leading to Ca<sup>2+</sup> influx and initiation of sperm motility in the common carp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97: 2052-2067.
- Kruger, JC.; Smit, GL.; Van Vuren, JHJ.; Ferreira, JT.; (2006). Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Fish Biology*; 24: 263-272.
- Latonnelle, K.; Le Menn, F.; Bennetau-Pelissero, C.; (2000). In vitro estrogenic effects of phytoestrogens in rainbow trout and Siberian sturgeon. *Ecotoxicology*; 9: 115-125.
- Le Bail, JC.; Champavier, Y.; Chulia, AJ.; Habrioux, G.; (2000). Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 $\beta$  and 17 $\beta$ -hydrosteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sciences*; 66: 1281-1291.
- Lehtinen, KJ.; Mattsson, K.; Tana, J.; Engström, C.; Lerche, O.; Hemming, J.; (1999). Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 42: 40-49.
- Morisawa, M.; Suzuki, K.; Shimizu, H.; Morisawa, S.; Yasuda, K.; (1983). Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*; 107: 95-103.
- Morisawa, M.; (2008). Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology*; 24: 362-370.
- Mylonas, CC.; Duncan, NJ.; Asturiano, JF.; (2016). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*; xxx: xxx-xxx.
- Nagao, T.; Yoshimura, S.; Saito, Y.; Nakagomi, M.; Usumi, K.; Ono, H.; (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*; 15: 399-411.
- Pérez, L.; Vílchez, MC.; Gallego, V.; Morini, M.; Peñaranda, DS.; Asturiano, JF.; (2016). Role of calcium on the initiation of sperm motility in the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 191: 98-106.
- Piros, B.; Glogowski, J.; Kolman, R.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J.; Horváth, Á.; (2002). Biochemical

- characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and starlet, *Acipenser ruthenus*. Milt plasma and spermatozoa. *Fish Physiology and Biochemistry*; 26: 289-295.
- Rurangwa, E.; Kime, D.E.; Olllevier, F.; Nash, J.P.; (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*; 234: 1-28.
- Secer, S.; Tekin, N.; Bozkurt, Y.; Bukan, N.; Akcay, E.; (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout semen. *Israeli Journal of Aquaculture*; 56: 274-280.
- Shaliutina-Kolešová, A.; Kotas, P.; Štěrba, J.; Rodina, M.; Dzyuba, B.; Cosson, J.; Linhart, O.; (2016). Protein profile of seminal plasma and functionality of spermatozoa during the reproductive season in the common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction & Development*; 83: 968-982.
- Shaliutina, A.; Hulak, M.; Dzuyba, B.; Linhart, O.; (2012). Spermatozoa motility and variation in the seminal plasma proteome of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) during the reproductive season. *Molecular Reproduction and Development* ; 79: 879-887.
- Soengas, J.L.; Sanmartin, B.; Barciela, P.; Aldegunde, M.; Rozas, G.; (1993). Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* related spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*; 105: 665-67.
- Verma, D.K.; Routray, P.; Dash, C.; Dasgupta, S.; Jena, J.K.; (2009). Physical and Biochemical Characteristics of Semen and Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 9: 67-76.
- Zadmajid, V.; (2016). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa + domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). *Aquaculture*; 463: 7-15.
- Zadmajid, V.; Imanpoor, M.R.; (2009). The correlation between some biochemical and spermatological parameters in goldfish (*Carassius auratus*) semen. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*; Vol. 16(1).
- Zadmajid, V.; Imanpoor, M.R.; Soudagar, M.; Shabani, A.; (2008). The effects of GnRHa, HCG and Pituitary extract on biochemical parameters of seminal plasma in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Iranian Journal of Biology*; 2(22): 333-342
- Zadmajid, V.; Imanpoor, M.R.; Sudagar, M.; shabany, A.; (2008). The effects of ovafact (GnRHa) on biological characteristics of semen in commons, comets, wakins and fantails goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*; 83: 9-17.
- Zhang, L.; Ikhlas, A.; Foran, C.M.; (2002). Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*; 132: 203-211.
- Zheng, W.; strobeck, C.; Stacey, N.E.; (1997). The steroid pheromone 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ , dihydroxy -4-progesterone-3-one increases fertility and paternity in gold fish. *Journal of Experimental Biology*; 200: 2833-2840.