مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره سوم، پیاپی بیست و سوم، زمستان ۱۳۹۶ (۱۱۶-۱۰۵)

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

الهام نظافتیان[1*]، وحید زادمجید[2]

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۷/۳۰)

چکیده

در ایـن مطالعـه، اثـرات جنستئیـن و ۱۷بتـا-استرادیول بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای سمینال ماهی قرمز در مرحله اسپرمیشن مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان مولد نر (با وزن تقریبیg ۳۰ تا g٤۰) تحت تزریق داخل عضلانی µg/g ۵ (G5) و ۵۰µg/g جنستئین (G50)، g/g µ۱۰ هورمون ۱۷بتا-استرادیول، µg/g۱۰روغن ذرت + DMSO قرار گرفتنـد. سپس از ماهیان اسپرم‌گیری به عمل آمد و برخی ترکیبات غیرآلـی، ترکیـبات آلـی و آنزیمی پلاسمای سمینال اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در ترکیبات غیرآلی، ترکیبات آلی و آنزیمی پلاسمای سمینال بین تیمـارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجـود دارد (P<۰/۰۵). 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. همچنیـن کـاهش معنی‌داری در غلظـت‌های ALT و AST در تیمارهای E2، G5 و G50 نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در صورتـی کـه غلظـت ALP در تیمـارای E2 و G50 به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج این پژوهش بر این نکته تأکید دارد که میزان جنستئین به عنوان یک ترکیب فیتواستروژنی در جیره غذایی مولدین باید بررسی شود؛ چرا که حضور این ترکیبات استروژنی در دوزهای بالا، از طریق تغییر در ترکیبات پلاسمای سمینال، باعث تغییر معنی‌داری در کیفیت اسپرم خواهد شد.

واژه‌هـای کلیـدی: جنـستئین، ۱۷ بتـا-استـرادیـول، ماهی قرمز، پلاسمای سمینال.

The Effect of Genistein on Some Biochemical and Enzyme Features of Deminal Plasma in Male Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)

Elham Nezafatian[1*], Vahid Zadmajid[2]

1. M. A., 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)

Abstract

This study investigated the effects of genistein and 17β-estradiol (E2) on some biochemical and enzyme features of seminal plasma in male gibel carp during the spermiation phase. Mature male gibel carps (with ~ 30 to 40 g body weight (BW)) received intramuscular injections of one of two genistein doses (5 µg/g BW; G5, or 50 µg/g BW; G50), (10 µg/g BW 17β-estradiol, E2), 10 µg/g BW corn oil+ DMSO .Then, milts 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 increased in the E2-treated fish, while the values of urea and triglyceride decreased in E2, G5 and G50-treated fish when compared to the control group. There was a significant decrease in seminal plasma ALT and AST levels in E2, G5, G50 treatments relative to the control fish ($p<0.05$). However, seminal plasma ALP significantly increased in E2 and G5-treated fish. The results of this study emphasizes that the amount of genestein as a phytoestrogenic compound in broodstock aquafeeds should be considered since high doses of this estrogenic compounds could impair sperm quality by changing the seminal plasma composition.

Keywords: Genistein, 17β-Estradiol, Gibel Carp, Seminal Plasma Compositions.

* نویسنده مسئول: الهام نظافتیان E-mail: e.nezafatian@gmail.com

مقدمه

امروزه به طور فزاینده‌ای عملکرد تولیدمثلی ماهیان به منظور ارزیابی تأثیرات مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز[1] در محیط‌های آبی و یا در جیره‌های غذایی آنها مورد بررسی قرار گرفته است. محققان بیان کرده‌اند که مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز به عنوان استروژن‌های خارجی زیست‌محیطی می‌توانند عملکرد استروژن‌های داخلی بدن بویژه E2 را تقلید کنند (Lehtinen *et al*., 1999; Bjerselius *et al*., 2001). ملاحظات زیست‌محیطی 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 فراورده‌های 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 جنستئین (4′,5,7-trihydroxyisoflavone) به‌عنوان یک فیتواستروژن موجود در سویا نقش مختل‌کننده در عملکرد غدد درون ریز را بازی می‌کند و بر روی اعمال تولیدمثلی ماهیان تأثیرگذار است (Bennetau-Pelissero *et al*., 2001). جنستئین فراوانترین و بیشترین فعالیت بیولوژیکی را در میان ایزوفلاون‌های سویا داراست 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 جنستئین 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). در بررسی‌ها به اثبات رسیده است که جنستئین می‌تواند سنتز ویتلوژنین را در ماهیان نر تاسماهی سیبری *Acipenser baeri* و قزل‌آلای رنگین کمان *Oncoryhnchus mykiss* القاء کند و باعث اختلال در استروئیدسازی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *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 جنستئین در زمینه کیفیت اسپرم ماهیان انجام شده است. نتایج برخی از این مطالعات حاکی از کاهش کیفیت اسپرم در ماهیان است. برای مثال Green & Kelly (2008) گزارش کردند که انکوباسیون بافت بیضه گربه ماهی *Ictalurus punctatus* و اردک ماهی *Sander vitreus* در حضور غلظت‌های مختلف جنستئین 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 جنستئین باعث تسریع در فرایند اسپرماتوژنز و همچنین کاهش تحرک و غلظت اسپرم در زمان تخم‌ریزی شد. در مطالعه Bagheri *et al.* (2013) نیز مشخص شد 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، از جمله توان حرکت و قدرت نفوذ به تخمک در ماهیان تأثیرگذار باشند. عواقب تولیدمثلی 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)

نیستند (Green & Kelly, 2008). از آنجایی‌که 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 جنستئین 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 است، یافت می‌شود و ماهیان روزانه در تماس با آن هستند) و دارویی (۵۰µg/g)، بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای سمینال ماهی قرمز که به عنوان یک مدل مناسب خانواده کپور ماهیان است، 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 برای 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 برای نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوادهی، کلرزدایی شد و شرایط فیزیکوشیمیایی آب در حد بهینه برای گونه کنترل شد (درجه حرات آب ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد؛ اکسیژن محلول ۰/۰۲±۷ mg/L؛ نیتریت ۰/۰۱±۰/۱۲ mg/L؛ سختی کل ۱۵/۱±۱۸۴/۶ mg/L؛ پی-اچ ۰/۳±۸/۲. 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 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 صورتی‌که مولدین رسیده ماده واجد شکم نرم و برآمده هستند. 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، جنستئین 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 ۵۰µg/g جنستئین (G50)، ۱۰ µg/g هورمون ۱۷بتا-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 جنستئین بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی پلاسمای اسپرمی، در روز دهم آزمایش بعد از خشک کردن منفذ تناسلی بدون

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 g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (eppendorf 5810 R, Germany) شدند. بعد از سانتریفیوژ، پلاسمای منی که در قسمت بالای ویال قرار دارد (سوپر نتنت[1]) به درون ویال های جدید انتقال داده شد و مشخصات مربوطه به ماهی و مرحله آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شد و ویال یاد شده توسط پارافیلم و درب پلاستیکی بسته و در دمای زیر انجماد (۲۰- 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 آسپارتات 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.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده در ارتباط با فاکتتورهای 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 (α= ۰/۰۵)، به عنوان POST HOC، برای مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها و عملیات مربوط، به‌وسیله نرم‌افزار spss انجام شد (SPSS 16, Chicago, IL). داده‌ها در نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد (± 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>۰/۰۵). 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<۰/۰۵). نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم بیان کرد که در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵)؛ به گونه‌ای که بالاترین غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم به ترتیب در تیمارهای G50 و E2 مشاهده شد.

1. Ssupernatant

جدول ۱. برخی ترکیبات غیر آلی پلاسمای سمینال ماهی قرمز (میانگین ± خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ٤ (G50)
سدیم (mmol/l)	۵۱/۴۹± ۳/۶۲[a]	۶۶/۲۳±۱/۱۸[ab]	۵۲/۰۹±۵/۵۷[a]	۷۹/۵۹±۳/۸۸[b]
پتاسیم (mmol/l)	۴۳/۹۴±۱/۰۷	۴۱/۴۹±۱/۱۴	۴۱/۵۴±۱/۴۱	۴۱/۶۶±۰/۶۰
کلر (mmol/l)	۱۰۰/۰۷±۱/۶۸	۹۷/۸۴±۳/۱۳	۹۹/۱۳±۳/۷۲	۹۶/۹۹±۲/۳۳
کلسیم (mg/dl)	۵/۳۳±۰/۱۴[a]	۴/۵۲±۰/۰۸[a]	۵/۴۳±۰/۴۰[ab]	۵/۵۶±۰/۲۰[b]
منیزیم (mg/dl)	۱/۶۲±۰/۱۳[a]	۲/۵۵±۰/۰۹[b]	۱/۴۷±۰/۲۴[a]	۱/۹۴±۰/۱۰[ab]

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

ترکیبات آلی پلاسمای 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<۰/۰۵). به گونه‌ای که بیشترین میزان فسفر و کراتینین در تیمار E2 مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که غلظت اوره پلاسمای سمینال تحت تأثیر تیمارهای E2 و G50 کاهش معنی‌داری را نسبت به دو تیمار کنترل و G5 نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین کاهش معنی‌داری در غلظت اوره در تیمار G5 نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵). مطابق جدول ۲، اختلاف معنی‌داری در غلظت تریگلیسرید پلاسمای 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<۰/۰۵).

ترکیبات آنزیمی پلاسمای 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<۰/۰۵). مطابق جدول ۳، اختلاف معنی‌داری در غلظت AST در بین تیمارهای مختلف مشاهده شد (P<۰/۰۵). به گونه‌ای که کمترین غلظت AST متعلق به تیمارهای 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<۰/۰۵). به طوری که بیشترین غلظت ALP در تیمار G50 مشاهده شد.

جدول ۲. برخی ترکیبات آلی پلاسمای سمینال ماهی قرمز (میانگین ± خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳ (G5)	تیمار ٤ (G50)
فسفر (mg/dl)	۱/۶۸±۰/۸۶[a]	۵/۰۶±۰/۷۰[b]	۱/۴۴±۰/۲۰[a]	۲/۳۱±۰/۵۲[a]
گلوکز (mg/dl)	۱/۲۴±۰/۰۵[a]	۱/۳۵±۰/۰۳[a]	۱/۲۶±۰/۰۸[a]	۱/۴۵±۰/۰۵[a]
اوریک اسید (mg/dl)	۰/۵۰±۰/۱۴[a]	۰/۶۸±۰/۰۹[a]	۰/۴۹±۰/۱۰[a]	۰/۴۲±۰/۰۵[a]
اوره (mg/dl)	۱۱/۱۵±۰/۹۲[c]	۲/۴۸±۰/۵۳[a]	۵/۹۵±۰/۹۸[b]	۲/۰۴±۰/۵۷[a]
کلسترول (mg/dl)	۶/۵۱±۰/۵۵[a]	۷/۰۹±۱/۱۴[a]	۶/۲۳±۰/۴۰[a]	۵/۰۱±۰/۹۵[a]
تریگلیسرید (mg/dl)	۲۲/۴۶±۳/۹۲[b]	۱۰/۰۳±۰/۴۰[a]	۱۰/۵۶±۰/۷۱[a]	۱۳/۰۹±۲/۳۳[ab]
کراتینین (mg/dl)	۰/۴۷±۰/۰۷[a]	۰/۹۲±۰/۰۸[b]	۰/۵۰±۰/۰۷[a]	۰/۶۶±۰/۱۲[ab]
پروتئین کل (g/dl)	۰/۲۴±۰/۰۶[a]	۰/۳۹±۰/۱۱[a]	۰/۲۴±۰/۰۲[a]	۰/۲۳±۰/۰۵[a]

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

جدول ۳. برخی ترکیبات آنزیمی پلاسمای سمینال ماهی قرمز (میانگین ± خطای استاندارد)

متغیر	تیمار ۱ (C)	تیمار ۲ (E2)	تیمار ۳(G5)	تیمار ٤(G50)
(U/L) ALT	۱۶/۲۸±۰/۴۱[b]	۷/۲۰±۱/۱۳[a]	۴/۲۳±۰/۴۱[a]	۶/۸۳±۱/۳۱[a]
(U/L) AST	۶۹/۵۹±۶/۸۷[c]	۳۷/۲۷±۳/۹۷[b]	۱۹/۴۴±۰/۹۶[a]	۲۸/۹۰±۱/۳۴[ab]
(U/L) ALP	۱۲/۳۱±۰/۵۴[a]	۳۷/۵۳±۱/۷۹[b]	۱۰/۴۱±۱/۵۷[a]	۴۲/۲۱±۱/۳۷[b]

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

سمن[1] یا میلت، از اسپرماتوزوآ و پلاسمای سمینال تشکیل شده است. پلاسمای سمینال حاوی ترکیباتی است که بعضی از این ترکیبات از اسپرماتوزوآ نگهداری می‌کنند و برخی دیگر رابط بین سیستم تولیدمثل و اسپرماتوزوآ هستند (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 پلاسمای سمینال می‌تواند انتخاب مولد مناسب را برای به‌دست آوردن اسپرم با کیفیت بهتر آسان کند (Rurangwa *et al.*, 2004). مطالعات روی خصوصیات سمن به‌منظور فهم فرآیندهای بیوشیمیایی در حرکت اسپرم (Coward *et al.*, *al.*, 2002; Ingerman *et al.*, 2002; Itoh *et* 2003; Kowalski) و همچنین توانایی لقاح تولیدمثلی گونه‌های مختلف ماهیان (Coward *et al.*, 2002; 2005 Rurangwa *et al.*, 2004; Alavi *et al.*,) و بهبود روش‌های نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت اسپرم (Piros *et al.*, 2002) صورت می‌گیرد. پلاسمای 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 پلاسمای 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 گفته 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 پلاسمای 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 است که می‌تواند نشان‌دهنده کیفیت بالای اسپرم باشد (Zadmajid & Imanpoor, 2005).

1. Semen

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^{+} درون‌سلولی با فعال شدن تحرک اسپرم در مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*) افزایش می‌یابد (Gallego *et al*., 2014). از این‌رو، به‌نظر 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 آنجایی‌که زمان انجام این تحقیق مصادف با زمان تولیدمثل ماهی قرمز بود، شاید بتوان افزایش در سطح کلسیم پلاسمای سمینال را نشان‌دهنده ایجاد یک اختلال بر میزان کلسیم در اثر تماس ماهی با دوز ۵۰µg/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 در لیتر برسد، تأثیر منفی بر روی تحرکت اسپرم خواهد داشت. همچنین نتایج یک تحقیق که به بررسی تأثیر هورمون اووافکت (GnRHa) بر خصوصیات زیست‌شناسی پلاسمای 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 شود. مطالعات انجام شده در مورد ترکیبات آلی پلاسما اسپرمی محدود هستند 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 اسپرماتوژنزیز، تحرک اسپرم، حفظ ثبات غشای 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[1] (*Perca fluviatilis*) مشخص شده که پلاسمای سمینال این ماهی حاوی پروتئین‌هایی است که در تبادلات غشای اسپرم، سازماندهی و تحرک اسپرماتوزوآ و همچنین فعالیت

1. Eurasian perch

آنزیم‌های اکسیدوردکتاز[1] دخالت می‌کنند (Shaliutina *et al.*, 2012). نتایج بررسی‌ها، وجود همبستگی پایین بین کلسترول پلاسمای سمینال و طول دوره تحرک اسپرم در ماهی قزل‌آلای 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 پروتئین‌کل پلاسمای سمینال ایجاد نمی‌کنند.

وجود گلوکز در پلاسمای سمینال ماهیان به عنوان منبع انرژی در طی تولید اسپرماتوزوآ نقش داشته (Soengas *et al.*, 1993) و به‌عنوان یک حمایت‌کننده خارجی از غشای اسپرماتوزوآ حمایت می‌کند (Bjerselius *et al.*, 1995). مطالعات محققان بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *O. mykis* 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 جنستئین و E2 بر روی گلوکز پلاسمای 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 جنستئین و یا E2 تغییر نمی‌کند. از آنجایی‌که اطلاعات در رابطه با نقش بسیاری از ترکیبات آلی موجود در پلاسما سمینال ماهیان محدود است، 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 جنستئین و یا E2 قرار می‌گیرند و موجب تغییر در سطح طبیعی آنها می‌شوند.

مطالعات در زمینه سیستم‌های آنزیمی ماهیان به خوبی آنچه در پستانداران مشخص شده، شناخته نشده‌اند. هرچند مطالعات محدودی که در این زمینه انجام شده نشان می‌دهد که آنزیم‌های پلاسمای 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 تأمین کند. نقش آنزیم‌هایی از قبیل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات 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 cypermetrina (یک مختل‌کننده غدد درون‌ریز) قرار دادند و نتایج حاکی از کاهش سطح ALT، AST و ALP در اغلب بافت های مورد آزمایش بود. محققان نشان دادند که کاهش فعالیت ALT، AST و ALP نسبت به گروه کنترل، باعث می‌شود که انتقال عامل آمینی و عملکرد اکسیداتیو در آنها غیرفعال شود. از طرفی دیگر Cirezko *et al.* (1993) نیز بیان کرده‌اند که رابطه معنی‌داری بین سطح فعالیت آنزیم AST در اسپرم تازه با درصد تخم‌گشایی ماهی وجود دارد. در مطالعه حاضر مشخص شد که میزان

1. Oxido-reductase

آنزیم‌های AST و ALT پلاسمای سمینال در تیمارهای E2 و جنستئین 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 آنزیم‌های پلاسمای سمینال 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 به صورت 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 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 آنجایی که 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 پلاسمای خون می‌شود، ممکن است بتواند برروی شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای سمینال نیز تأثیر بگذارد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر هرچند که در تیمارهای E2 و G50 اختلالاتی در میزان برخی ترکیبات آلی و معدنی پلاسما سمینال مشاهده شد اما تماس ماهیان با میزان دوزی از جنستیئن 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).

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 کرد.

REFERENCES

Alavi, SMH.; Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes: Effects of temperature and pH: a review. Cell biology international; 29: pp. 101-110.

Alavi, SMH.; Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolarity: a review. Cell Biology International; 30: pp. 1-14

Aramli, MS.; Nazari, RM.; Kalbassi, MR.; Aramli, S. (2013). Semen of Beluga, *Huso huso*: Ionic content and 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 ingoldfish by feeding diets containing soybean meal. Animal Reproduction Science; 139: pp. 136-144.

Beenetau-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: pp. 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: pp. 292-299.

Billard, R.; Cosson, J.; Perchec, G.; Linhart, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture; 129: pp. 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*β*-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: pp. 221-230.

Bobe, L.; Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology; 165: pp. 535-548.

Chen, S.; Kao, Y.C.; Laughton, C.A. (1997). Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; 61: pp. 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: pp. 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: pp. 460-486.

Clearwater, SJ.; Crim, LW.; Gonadotropin releasing hormone analogue treatment increased sperm production in yellowtail flounder *pleuronectes ferrugineus*. Fish Physiology and Biochemistry; 19: pp. 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: pp. 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: pp. 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 Ca2+, K+ and pH after spermmotility activation in the European eel (*Anguilla anguilla*): preliminary results. Aquaculture; 418-419: pp. 155-158.

Green, CC.; Kelly, AM. (2008). Effect of

the exogenous soyabean phytooestrogen 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: pp. 2485-2499.

Huang, R. Q.; Fang, M. J.; Dillon, G. H. (1999). The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors. Molecular Brain Research; 67: pp. 177-183.

Ingerman, R.; Holcomb, M.; Robinson, M. L.; Cloud, J. C. (2002). Carbon dioxide and pH effect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Journal of Experimental Biology; 205: pp. 2885-2890.

Itoh, A.; Inaba, K.; Ohtake, H.; Fujinoki, M.; Morisawa, M. (2003). Characterization of Camp-dependent protein kinase catalytic subiunit 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: pp. 1-9.

Kowalski, R.; Wojtczak, M.; Glogwski, 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: pp. 438-444.

Krasznai, Z.; Marian, T.; Izumi, H.; Damjanovich, S.; Balkay, L.; Trón, L.; et al. (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca2 C channels leading to Ca2 C in ux and initiation of sperm motility in the common carp. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 97: pp. 2052-2067.

Kruger, J.C.; Smit, G.L.; Van Vuren, J.H.J.; Ferreira, J.T. (2006). Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). Journal of Fish Biology; 24: pp. 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: pp. 115-125.

Le Bail, JC.; Champavier, Y,; Chulia, AJ.; Habrioux, G. (2000). Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β-hydrosteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. Life Sciences; 66: pp. 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: pp. 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: pp. 95-103.

Morisawa, M. (2008). Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. Journal of Applied Ichthyology ; 24: pp.362-370.

Mylonas, C.C.; Duncan, N.J.; Asturianoc, J.F. (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: pp. 399-411.

Pérez, L.; Vílchez, M.C.; Gallego, V.; Morini, M.; Peñaranda, DS.; Asturiano, J.F. (2016). Role of calciumon the initiation of spermmotility in the

European eel. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology; 191: pp. 98-106.

Piros, B.; Glogowski, J.; Kolman, R.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J.; Horváth, Á. (2002). Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser beari* and starlet, *Acipenser ruthenus*. Milt plasma and spermatozoa. Fish Physiology and Biochemistry; 26: pp. 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: pp. 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: pp. 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: pp. 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: pp. 879-887.

Soengas, J.L.; Sanmartin, B.; Barrciela, P.; Aldegunde, M.; Rozas, G. (1993). Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* related spermatogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry; 105: pp. 665-67.

Verma, DK.; 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: pp. 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: pp. 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): pp. 333-342

Zadmajid, V.; Imanpoor, MR.; 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: pp. 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: pp. 203-211.

Zheng, W.; strobeck, C.; Stacey, N.E. (1997). The steroid pheromone 17α, 20β, dihydroxy -4-prognen-3-one increases fertility and paternity in gold fish. Journal of Experimental Biology; 200: pp. 2833-2840.