(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

مقاله پژوهشی

اثرات ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول (EE2) بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فرشته‌ماهی آب شیرین (*Pterophyllum scalare*)

- **محمدحسین ناصری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست،دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **محمدرضا ایمان‌پور***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **ولی‌ا... جعفری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **امید صفری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸

چکیده

به‌علت ویژگی ماندگاری زیاد ترکیبات استروژنی، اغلب آن‌ها در موجودات آبزی تجمع زیستی می‌یابند. این ویژگی به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم می‌تواند بر میزان رشد آبزیان اثرگذار باشد. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فرشته‌ماهی آب شیرین بود. تعداد ٦٣ قطعه از فرشته‌ماهیان با میانگین وزنی ٤/٣١±٠/٤٦ گرم به‌طور تصادفی به ۳ گروه مساوی، در سه تکرارتقسیم شدند. در غذای گروه اول هیچ‌گونه هورمونی استفاده نگردید ولی در گروه دوم و سوم به‌ترتیب ۲/۵ و ۵ میکروگرم در کیلوگرم از هورمون EE_2 با غذای ماهی ترکیب شدند. ماهیان، دو بار در روز و در حد سیری غذادهی شدند. در این آزمایش، میزان رشد ویژه (۰/۲۲ درصد در روز)، میزان وزن به‌دست آمده (٨٨/٤ درصد) و فاکتور وضعیت (١/٧٦) فرشته‌ماهیان گروه دوم در مقایسه با گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافت. هم‌چنین تغییرات معنی‌داری ($P<0/05$) در پارامترهای خونی فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول ایجاد شد. این تغییرات به‌طور معنی‌داری به‌صورت افزایشی، در میزان گلبول‌های قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct)، میزان‌حجم گلبول‌قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) ماهیانی که از دو سطح ۲/۵ و ۵ میکروگرم هورمون EE_2 در کیلوگرم غذا تغذیه کرده بودند، نسبت به گروه شاهد مشاهده شدند. ارزیابی نتایج در این آزمایش نشان داد که استفاده محدود از هورمون EE_2 می‌تواند باعث افزایش رشد در فرشته‌ماهیان آب شیرین گردد.

کلمات کلیدی: ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول، فرشته‌ماهی آب شیرین، شاخص‌های رشد، پارامترهای خونی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: imanpoor@gau.ac.ir

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

مقدمه

وجود مواد شیمیایی در محیط‌زیست که در عملکرد طبیعی سیستم‌های درون‌ریز انسان و دیگر جانداران ایجاد اختلال می‌کند، به‌عنوان یک موضوع مهم در بسیاری از تحقیقات مطرح شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۲). در هر دو مطالعات میدانی و آزمایشگاهی، شواهد فراوان نگران‌کننده‌ای درخصوص اثرات زنوبیوتیک‌ها از قبیل اختلال در سیستم درون‌ریز آبزیان، افزایش ویتلوژنین پلاسما در ماهی نر و ماده، افزایش سهم ماهیان دوجنسی، کاهش تولید تخم و اسپرم، کاهش کیفیت گامت، ماده‌سازی کامل ماهی نر، کاهش هم‌آوری و لقاح و نیز تغییرات رفتاری مشاهده شده است (Aris و همکاران، ۲۰۱۴). این ویژگی‌ها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم می‌توانند میزان بازماندگی، وضعیت رشد ارگانیسم‌ها در مراحل اولیه زندگی و نیز موفقیت در تولیدمثل (از قبیل موفقیت لقاح و تخم‌گشایی) را کاهش دهند و هم‌چنین بر جمعیت آبزیان اثرگذار باشند (Yan و همکاران، ۲۰۱۲). هورمون ۱۷ α اتینل استرادیول (C20H24O2)(EE2) مشتق شده از هورمون طبیعی ۱۷ β استرادیول (E2) است و دارای ساختار شیمیایی مشابه می‌باشند. EE2، در اغلب فرمولاسیون‌های جدید قرص‌های ضدبارداری وجود دارد و معمولاً یکی از داروهای پرمصرف در تجویزهای دارویی محسوب می‌شود. این هورمون در اتانول (۱ قسمت در ۶ قسمت اتانول) بسیار اندک انحلال‌پذیر است ولی در مقایسه با استروئیدهای جنسی طبیعی انحلال‌پذیری نسبتاً کم‌تری در آب (۴/۸ میلی‌گرم در لیتر در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) دارد. مسیر ورود EE2 به محیط زیست عمدتاً از طریق تخلیه فاضلاب، فاضلاب بیمارستان‌ها، فعالیت‌های دامپروری و کشاورزی می‌باشند (Ying و همکاران، ۲۰۰۲). از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هورمون‌های جنسی سنتتیک می‌توان به غیرقطبی بودن، وجود ترکیبات ارگانیک هیدروفوب با تغییرپذیری پائین و مقاومت به فرایند تجزیه زیستی اشاره کرد (Colman و همکاران، ۲۰۰۹؛ Feng و همکاران، ۲۰۱۰؛ Li و همکاران، ۲۰۱۳). یک عامل مهم که سبب کاهش غلظت هورمون‌ها در فاز آبی می‌شود، جذب آن‌ها در خاک و رسوبات می‌باشد (Lai و همکاران، ۲۰۰۰؛ Ying و همکاران، ۲۰۰۲؛ Des Mes و همکاران، ۲۰۰۵). برای مثال در مطالعه Labadie و Hill (۲۰۰۷)، سطوح ترکیبات استروژن موجود در رسوبات رودخانه‌ها بین ۰/۱۲ تا ۲۲/۸۰ نانوگرم درگرم، در مصب‌ها بین ۰/۰۵ تا ۲/۵۲ و در مناطق ساحلی دریا بین ۰/۰۵ تا ۳/۶ نانوگرم درگرم گزارش‌شد. به‌علت ویژگی ماندگاری زیاد و هیدروفوبی ترکیبات استروژنی، اغلب آن‌ها همانند EE2 در ارگانیسم‌های آبزی تجمع زیستی می‌یابند (Mazotto و همکاران، ۲۰۰۸). در انسان تمایل اتصال EE2 به گیرنده‌های استروژنی یک تا دو برابر و در برخی گونه‌های ماهیان ۵ برابر بیش‌تر از E2 مشاهده شده است. این قدرت تمایل زیاد، نشان دهنده این است که EE2 می‌تواند یک ترکیب استروژنی قوی در زمان اتصال به گیرنده‌های استروژنی باشد، و طبیعتاً با E2 تولید شده حتی در غلظت‌های بسیار اندک و هم‌چنین با دیگر آلاینده‌های ارگانیک حاصل از فعالیت انسان مقایسه می‌شوند (Saaristo و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lima و همکاران، ۲۰۱۲؛ Tomsikova و همکاران، ۲۰۱۲). در حال حاضر، مطالعات اندکی، درخصوص بررسی اثرات هورمون EE2 انجام شده است. برای مثال، در مطالعه Dussault و همکاران (۲۰۰۹) تجمع زیستی EE2 در بی‌مهرگان بنتیک از قبیل *Cironomus tentans* و *Hyalella azteca* در آب و رسوبات بررسی گردید. نتایج به‌دست آمده، میزان تجمع EE2 در *C. tentans* نسبت به *H. azteca* را کم‌تر نشان دادند درحالی‌که تجمع زیستی اتینیل استرادیول در *C. tentans* موجود در عمق رسوبات بیش‌تر از بی‌مهرگان دیگر مشاهده شد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که مصرف گزینه‌های غذایی مثل بی‌مهرگان موجود در رسوبات به‌عنوان یک منبع مواد استروژنی برای مهره‌داران محسوب می‌شوند. ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول، در کم‌ترین میزان خود نیز می‌تواند روی جوامع زیستی اثرگذار باشد. به‌عنوان نمونه، Pawlowski و همکاران (۲۰۰۴) پائین‌ترین غلظت مؤثر مشاهده شده (LOEC) EE2 برای ویتلوژنین پلاسما القاء شده در دو جنس نر و ماده و برای تغییرات ساختاری در کبد و بیضه‌ها را در گونه‌ای از ماهی کپور (*Pimephales promelas*) تحت تأثیر ترکیبات استروژنی به‌مدت سه هفته، ۱ نانوگرم درلیتر گزارش دادند. آبزیان در مراحل مختلف زندگی به استروژن‌ها بسیار حساس هستند (Liu و همکاران، ۲۰۱۲). برای مثال تمامی بچه ماهیان جنس نر مداکا (*Oryzias latipes*) در زمان قرارگرفتن در معرض ۱۰۰ نانوگرم در لیتر EE2 برای یک دوره دو ماهه تغییر جنسیت دادند، ولی تولید تخم‌ها به‌دلیل کاهش وزن گنادی ماهیان ماده در زمان قرارگیری در معرض ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم در لیتر EE2، کاهش یافت (Scholz و Gutzeit، ۲۰۰۰). در مطالعه‌ای دیگر، هورمون EE2 باعث توسعه ناقص پاپیلای جنسی و جلوگیری از توسعه جنسی ماهی گامبوزیا (*Gambusia affinis*) شد (Angus و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین، Peters و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش دادند که تخم‌های لقاح یافته ماهی مومی چوگ (*Fundulus heteroclitus*)، بعد از قرارگیری در معرض ۱۰۰ نانوگرم در لیتر EE2، دچار کاهش دوره انکوباسیون تخم‌ها، افزایش طول لارو و بازماندگی بیش‌تر نسبت به دیگر گروه‌های آزمایشی گردیدند. علاوه براین، ماهیان مربوط به تیمار ۱۰۰ نانوگرم در لیتر به لحاظ جنسیت، مایل به جنس ماده (بیش از ۸۰ درصد فنوتیپ ماده) و برخی از ماهیان نر ویژگی‌های ثانویه ماهیان ماده را به نمایش می‌گذاشتند. در بچه‌ماهیان زبرا (*Danio rerio*) نیز، در غلظت ۱ نانوگرم در لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت جنسی به سمت ماهی جنس ماده مشاهده شد و در غلظت ۲ نانوگرم در لیتر تغییر

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

جنسیت به‌طور کامل انجام شد (Orn و همکاران، ۲۰۰۳). در آزمایش Juarez و همکاران (۲۰۱۷)، بیش‌ترین میزان رشد ویژه ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مربوط به تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ میکروگرم هورمون EE2 در کیلوگرم غذا بود. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۷) نیز، میزان رشد گربه‌ماهیان زرد جوان (*Pelteobagrus fulvidraco*) در زمان قرارگیری در معرض هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول نسبت به گروه شاهد، بیش‌تر مشاهده گردید. در یک مطالعه موردی دیگر، ناجی و همکاران (۱۳۸۸)، نشان دادند که افزایش جذب هورمون EE2 توسط ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، سبب افزایش میزان رشد ویژه ماهیان نسبت به گروه شاهد می‌گردد. فرشته‌ماهی آب شیرین (*Pterophyllum scalare*)، یکی از ماهیان بومی آمریکای جنوبی متعلق به خانواده سیچلیده می‌باشد و از زمان ورود به آکواریوم‌ها در سال ۱۹۱۱ میلادی جایگاه منحصر به‌فردی در صنعت ماهیان زینتی داشته است. از نظر تغذیه‌ای جزء گروه همه‌چیزخوار طبقه‌بندی شده‌اندو می‌توان با استفاده ازجیره‌های غذایی دست‌ساز در شرایط محیطی مناسب از آن نگه‌داری نمود (Shelar و همکاران، ۲۰۱۴). فرشته‌ماهی، جزو آن دسته از ماهیانی است که بعد از رسیدگی جنسی در یک بازه زمانی مشخص به‌صورت متوالی تخم‌ریزی می‌کنند (Degani و همکاران، ۱۹۹۷). هم‌چنین، به‌راحتی در اندازه‌های مختلف در بازار موجود می‌باشند و به آسانی با شرایط محیطی جدید سازگار می‌شوند. در واقع، فرشته‌ماهی به‌دلیل دارا بودن ظرفیت اکولوژیکی زیاد می‌تواند به‌عنوان نماینده ماهیان گرمسیری، مخصوصاً ماهیان خانواده سیچلیده، در آزمایشات مورد مطالعه قرار گیرد (Iranshahi و همکاران، ۲۰۱۱). به همین دلیل، در آزمایش حاضر از این گونه ماهی استفاده گردید. با مصرف روزافزون اززنوبیوتیک‌هادرحوزه‌های‌مختلف آبزی‌پروری،دام‌پروری و کشاورزی، انجام مطالعات دقیق درخصوص اثرات منفی بالقوه بر موجودات که سبب افزایش آسیب‌ها شده‌اند، بسیار ضروری می‌باشند. بنابراین در مطالعه حاضر، اثرات ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فرشته‌ماهی بررسی گردید تا هرگونه اثر احتمالی این ماده تعیین شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی سیستم پرورش و تهیه ماهیان: این مطالعه در آزمایشگاه آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست دانشگاه فردوسی مشهد انجام گردید. بعد از آماده‌سازی سیستم‌های مداربسته،فرشته‌ماهیان در اندازه‌ای‌بین ۳۰ تا ۵۰ میلی‌متر از فروشگاه ماهیان زینتی خریداری شدند. درجه حرارت مناسب آب برای پرورش فرشته‌ماهی بین ۲۹-۲۷ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷/۸ تا ۹ تنظیم و برای ایجاد نور در آکواریوم (۱۴ ساعت‌روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) نیزازلامپ‌رشته‌ای فلوئورسنت استفاده‌شد(Ortega-Salas و همکاران، ۲۰۰۹).

طراحی آزمایش: هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول از شرکت داروسازی ابوریحان خریداری گردید. تعداد ۶۳ قطعه از فرشته‌ماهیان با میانگین وزن و طول اولیه به‌ترتیب ۰/۴۶±۴/۳۱ گرم و ۰/۱۵±۴/۳۴ سانتی‌متر به‌طور تصادفی به ۳ گروه مساوی، در سه تکرار تقسیم شدند. در گروه اول (شاهد) هورمون EE2 استفاده نگردید. در گروه دوم و سوم به‌ترتیب ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم غذا از هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول استفاده شدکه بهروش تبخیر اتانول با غذای ماهی ترکیب شدند. این مقادیر با توجه به بررسی مطالعات مختلف انجام شده در سال‌های اخیر و برآورد میزان تقریبی آن در محیط زیست آبی، انتخاب گردیده است (Aris و همکاران، ۲۰۱۴). در تمام مراحل آزمایش که ۳ ماه به‌طول انجامید از جیره‌غذایی گرانوله با مواد مغذی یکسان(جدول ۱) برای‌تغذیه ماهیان استفاده گردید. هم‌چنین، فرشته‌ماهیان، دو بار در روز و در حد سیری غذادهی شدند.

جدول ۱: درصد مواد مغذی جیره غذایی گرانوله جهت تغذیه فرشته‌ماهیان در سه گروه آزمایشی (Kasiri و همکاران، ۲۰۱۲)

پروتئین	چربی	فیبر	خاکستر	ویتامین	انرژی
۵۴	۱۸	۱/۵	۱۹	۲	۴/۵۴

محاسبه شاخص‌های رشد: در این آزمایش نرخ رشد ویژه (SGR)، میزان وزن به‌دست آمده (WGR) و فاکتور وضعیت (CF) طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Baoshan و همکاران، ۲۰۱۹):

$SGR = ln(C_1/C_0)/t_1-t_0$

SGR: ضریب رشد ویژه، C_1: وزن ماهی در انتها دوره، C_0: وزن ماهی در ابتدا، t_1: زمان انتهای دوره ، t_0: زمان ابتدای دوره

میزان وزن به‌دست آمده (WGR) =

۱۰۰ × (وزن نهایی- وزن اولیه) ÷ وزن اولیه

فاکتور وضعیت (CF) = (وزن بدن)÷(طول استاندارد)× ۱۰۰

ارزیابی شاخص‌های خونی: با توجه به اندازه کوچک فرشته ماهیان، خونگیری به‌روش قطع ساقه دمی انجام گردید. ماهیان قبل از خونگیری توسط تریکائین متانوسولفونات(MS222) بی‌هوش شدند. سپس،ناحیه ساقه‌دمی‌قطع و توسط لوله‌های‌مویینه‌هپارینه نمونه‌های خون گرفته شد (Batt و همکاران، ۲۰۰۵). تعداد کل گلبول‌های قرمز (RBC)و گلبول‌های سفید(WBC) با استفاده از پیپت ملانژور قرمز و سفید،لام‌نئوبار و محلول‌های‌رقیق‌کننده‌گاور و تورک توسط میکروسکوپ نوری شمارش شدند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۳). هماتوکریت (Hct)،

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) براساس فرمول‌های زیر محاسبه گردیدند(هدایتی و همکاران، ۱۳۹۳):

هماتوکریت (Hct)= میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)×تعداد کل گلبول‌های قرمز (RBC)×۰/۱

میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)= میزان هماتوکریت (درصد)×۱۰/تعداد گلبول‌های قرمز برحسب میلیون

میانگین هموگلوبین گلبول های قرمز (MCH)= میزان هموگلوبین ×۱۰/ تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون

میانگین غلظت هموگلوبین گلبول (MCHC)= میزان هموگلوبین×۱۰/ میزان هماتوکریت (درصد)

آنالیز آماری: تمامی پارامترهای ارزیابی شده به‌صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده‌اند. پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف (Zar، ۱۹۸۴)، تغییرات در شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فرشته‌ماهیان در هر سه گروه آزمایشی از طریق آنالیز واریانس one-way مورد آزمون قرار گرفتند. سپس میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد مقایسه شدند. هم‌چنین، تحلیل رگرسیونی جهت تخمین رابطه بین متغیرها انجام گردید. در ضمن، تمامی آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزارهای آماری SPSS ۱۶ و Excel انجام شد.

نتایج

شاخص‌های عملکرد رشد: جدول ۲، نشان‌دهنده میزان رشد ویژه (SGR)، میزان وزن به‌دست آمده (WGR) و فاکتور وضعیت (CF) در فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول می‌باشد. براساس آن، میزان رشدویژه و وزن به‌دست آمده در گروه شاهد به‌ترتیب برابر با ۰/۱۱ درصد وزن بدن در روز و ۴۳/۵۴ درصد ثبت گردیده است. اما با افزایش هورمون EE2 تا سطح ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم، نرخ رشدویژه و وزن به‌دست آمده به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) در مقایسه با گروه‌های دیگر به بیش‌ترین حد (به‌ترتیب ۰/۲۲درصد در روز و ۸۸/۴ درصد) رسید. اگرچه در گروه سوم، میزان هورمون EE2 به ۵ میکروگرم در کیلوگرم افزایش یافت، با این وجود هیچ افزایشی در نرخ رشد ویژه و میزان وزن به‌دست آمده فرشته‌ماهیان مشاهده نگردید و به‌ترتیب به‌میزان ۰/۱۴ درصد در روز و ۷۷/۷ درصد کاهش یافت. فاکتور وضعیت نیز برای فرشته‌ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول (۰، ۲/۵ و ۵ میکروگرم در کیلوگرم غذا) به‌ترتیب ۱/۶۶، ۱/۷۶ و ۱/۷۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب محاسبه گردید.

جدول ۲: بررسی شاخص‌های رشد در فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده باسطوح مختلف هورمون ۱۷- آلفا اتینیل استرادیول

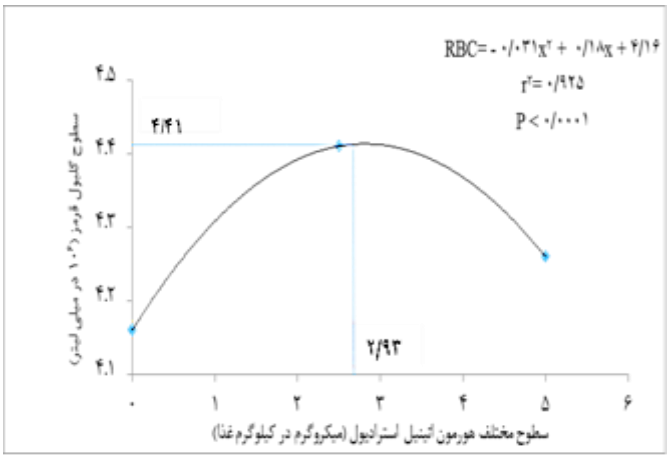
گروه آزمایشی	نرخ رشد ویژه (SGR) (درصد در روز)	میزان وزن به‌دست آمده (WGR) (درصد)	فاکتور وضعیت (CF) (گرم بر سانتی‌متر مکعب)
۰	۰/۱۱ ۰±/۰۳^{c}	۴۳/۵۴ ± ۴/۴^{c}	۱/۰±۶۶/۱۷^{b}
۲/۵	۰/۲۲ ۰±/۱۵^{a}	۸۸/۴ ± ۴/۵^{a}	۱/۰±۷۶/۱۶^{a}
۵	۰/۱۴ ۰±/۰۶^{b}	۷۷/۷ ± ۳/۸^{b}	۱/۰±۷۴/۰۵^{a}

* نقاط با حروف غیرمشترک در سطح ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر دارند.

ارزیابی شاخص‌های خونی: نتایج ارزیابی شاخص‌های خونی در فرشته‌ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول در جدول ۳، آمده است. براساس آن، میزان گلبول‌های قرمز در گروه شاهد برابر با ۴/۱۶ (۱۰۶ در میلی‌لیتر) مشاهده شد ولی با افزایش سطح هورمون در گروه دوم به‌میزان ۲/۵ میکروگرم، این مقدار به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافت و به ۴/۴۱ (۱۰۶ در میلی لیتر) رسید. از طرفی، با وجود این‌که در گروه سوم از سطح ۵ میکروگرم هورمون EE2 برای تغذیه فرشته‌ماهیان استفاده گردید، مقدار گلبول‌های قرمز نسبت به گروه دوم کاهش یافت و ۴/۲ (۱۰۶ در میلی‌لیتر) ثبت شد. براساس مدل رگرسیون خط شکسته بین میزان گلبول‌های قرمز خون فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷- آلفا اتینیل استرادیول (صفر، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم غذا) بیش‌ترین مقدار گلبول قرمز، ۴/۴۱ (۱۰۶ در میلی‌لیتر) در سطح ۲/۹۳ میکروگرم هورمون EE2 برکیلوگرم غذا تخمین زده شد (شکل ۱). هم‌چنین، میزان گلبول‌های سفید خون در ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد، ۱۳/۴۶ (۱۰۳ در میلی‌لیتر) ثبت گردید که نسبت به دو گروه آزمایشی دیگر (۲/۵ و ۵ میکروگرم در کیلوگرم) به‌طورمعنی‌داری ($P<0/05$) کم‌تر بود. میزان گلبول‌های سفید در دو گروه ۲/۵ و ۵ میکروگرم در کیلوگرم غذا به‌ترتیب ۱۳/۹۶ و ۱۳/۶۸ (۱۰۳ در میلی‌لیتر) مشاهده شد. در این آزمایش، بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید مربوط به گروه دوم است که به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی بیش‌تر بود. براساس مدل رگرسیون خط شکسته چندمتغیره بین میزان گلبول‌های سفید در خون فرشته ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷- آلفا اتینیل استرادیول (صفر، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم غذا) نیز بیش‌ترین مقدار گلبول‌های سفید، ۱۳/۹ (۱۰۳ در میلی‌لیتر) در سطح ۲/۸ میکروگرم هورمون EE2 در کیلوگرم غذا، تخمین زده شد (شکل ۲). به‌غیر از میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) نیز میان شاخص‌های خونی دیگر از قبیل هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون (Hb)، میانگین هموگلوبین گلبول

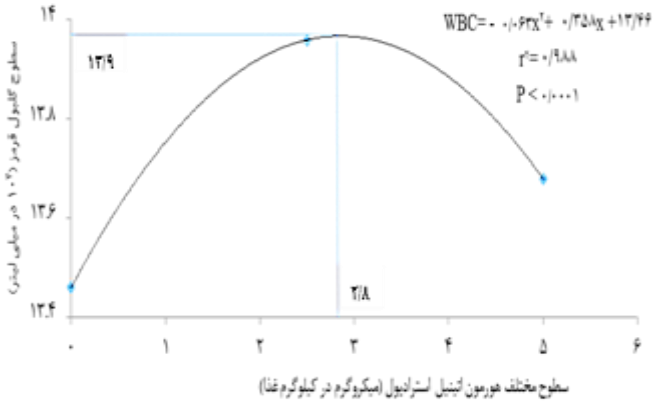
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

(MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول (MCHC) در بین گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که بیش‌ترین مقدار در تمامی آن‌ها مربوط به فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده با ۲/۵ میکروگرم هورمون EE2 در کیلوگرم غذا بود. کم‌ترین مقادیر نیز در گروه شاهد مشاهده شد.



شکل۱: مدل رگرسیون خط شکسته بین میزان گلبول قرمز در خون فرشته‌ماهی تغذیه‌شده باسطوح مختلف هورمون ۱۷- آلفا اتینیل استرادیول

بیش‌ترین میزان MCV در گروه شاهد (۳۲۱/۰۸) ثبت گردید و کم‌ترین مقدار نیز در ماهیان تغذیه شده با ۵ میکروگرم EE2 در کیلوگرم غذا، مشاهده گردید.



شکل۲: مدل رگرسیون خط شکسته بین میزان گلبول‌های سفید در خون فرشته‌ماهی تغذیه‌شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷- آلفا اتینیل استرادیول

جدول ۳: شاخص‌های خونی فرشته ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول

متغیر	سطوح مختلف هورمون اتینیل استرادیول			میانگین انحراف استاندارد	آنالیز رگرسیون	ضریب تبیین (r^2)	سطح معنی‌داری (p-value)
	۰	۲/۵	۵				
تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰^۶ در میلی‌لیتر)	۴/۱۶ c	۴/۴۱ a	۴/۲ b	۰/۰۳۳	Y=۴/۱۶ - ۰/۰۳۱ x^۲ + ۰/۱۸ x	۰/۹۲۵	۰/۰۰۰۱
تعداد گلبول‌های سفید (۱۰^۳ در میلی‌لیتر)	۱۳/۴۶c	۱۳/۹۶a	۱۳/۶۸ b	۰/۰۲۷	Y=۱۳/۴۶ – ۰/۰۶۳ x^۲ + ۰/۳۶ x	۰/۹۸۸	۰/۰۰۰۱
هماتوکریت (درصد)	۱۳/۳۶ c	۱۳/۹۶ a	۱۳/۴۳ b	۰/۰۲۳	Y=۱۳/۳۶ – ۰/۰۹۱ x^۲+ ۰/۴۷۱ x	۰/۹۹۴	۰/۰۰۰۱
هموگلوبین	۳/۹۷ c	۴/۳۸ a	۴/۱۵ b	۰/۰۲۵	Y=۳/۹۸ – ۰/۰۵ x^۲ + ۰/۲۹ x	۰/۹۷۸	۰/۰۰۰۱
MCV	۳۲۱/۰۸a	۳۱۶/۶b	۳۱۴/۸c	۲/۹۲	Y=۳۲۰/۶۵ + ۱/۲۶x	۰/۴۹۸	۰/۰۳۴
MCH	۹۵/۶c	۹۹/۳۲a	۹۷/۳۵b	۰/۵۹	Y=۹۵/۶ – ۰/۴۵۶x^۲ + ۲/۶۳x	۰/۹۰۲	۰/۰۰۱
MCHC	۲۹/۸c	۳۱/۳۶a	۳۰/۹۲b	۰/۲۲	Y=۲۹/۸ – ۰/۱۶۳x^۲ + ۱/۰۴x	۰/۹۰۷	۰/۰۰۱

*ردیف‌های با حداقل یک حرف غیرمشترک در سطح ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر دارند (P<۰/۰۵)

بحث

ارزیابی شاخص‌های رشد: ۱۷آلفا اتینیل استرادیول (EE_2)، یک هورمون سنتتیک و به‌لحاظ ساختاری مشابه هورمون طبیعی ۱۷بتا استرادیول (E_2) می‌باشد. EE_2، یک استروژن فعال زیستی خوراکی است و اغلب در تجویزهای دارویی برای انسان، فعالیت‌های دامی و آبزی پروری استفاده می‌شود. از هورمون EE_2 برای بهبود بخشیدن فعالیت تولید از طریق القاء افزایش سرعت رشد، جلوگیری و درمان اختلالات تولیدمثلی در دام‌ها استفاده می‌شود (Ying و همکاران، ۲۰۰۲؛ Noppe و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bartelt-Hunt و همکاران، ۲۰۱۱). در آبزی‌پروری نیز از ترکیبات هورمونی ۱۷آلفا اتینیل استرادیول برای توسعه جمعیت تک جنسی ماهی برای بهینه‌سازی رشد استفاده می‌گردد (Kuster و همکاران، ۲۰۰۵؛ Korner و همکاران، ۲۰۰۸). در این مطالعه، از دو سطح ۲/۵ و ۵ میکروگرم هورمون EE_2 در هرکیلوگرم غذا برای تغذیه

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

فرشته‌ماهیان استفاده شد. همان‌طورکه مشاهده گردید فرشته ماهیان تغذیه شده با ۲/۵ میکروگرم نسبت به گروه‌های شاهد و ۵ میکروگرم هورمون EE_2 در طول دوره آزمایش به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) دارای بیش‌ترین میزان رشد ویژه (۰/۲۲ درصد در روز) و میزان وزن به‌دست آمده (۸۸/۴ درصد) بودند. درحالی‌که با افزایش سطح هورمون تا ۵ میکروگرم، میزان رشد ویژه فرشته ماهیان (۰/۱۴ درصد در روز) و میزان وزن به‌دست آمده (۷۷/۷ درصد) کاهش یافت. فاکتور وضعیت نیز در فرشته‌ماهیان تغذیه‌شده با ۲/۵ میکروگرم‌هورمون ۱۷آلفا اتینیل استرادیول دارای بیش‌ترین مقدار (۱/۷۶ گرم بر سانتی‌متر مکعب) بود. تاکنون، مطالعات اندکی درخصوص اثرات هورمون‌های استروئیدی از جمله هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول (EE_2) بر شاخص‌های رشد ماهیان انجام شده است که در ادامه به آن اشاره می‌گردد. براساس نتایج به‌دست آمده، به‌نظر می‌رسد افزایش محدود هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول در غذای فرشته‌ماهی سبب افزایش میزان رشد ویژه و فاکتور وضعیت می‌گردد. زیرا استروژن‌ها با ایجاد تغییرات داخلی در هورمون‌رشد، انسولین و هورمون‌های تیروئیدی می‌توانند باعث افزایش رشد گردند (Matty، ۱۹۷۸). در یک مطالعه مشابه، Juarez و همکاران (۲۰۱۷)، اثرات ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول‌را بر رشد و ماده‌سازی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) بررسی کردند. نتایج نشان دادند که در یک دوره پرورشی ۱۲۵روزه، ماهیان تغذیه شده با ۱۰۰ میکروگرم هورمون EE_2 در کیلوگرم غذا، به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) دارای بیش‌ترین میزان‌رشد ویژه نسبت به گروه‌های‌دیگر بودند، اگرچه فاکتور وضعیت در تمامی گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. از طرفی، با افزایش غلظت‌هورمون در غذای ماهیان‌گروه‌های سوم، چهارم و پنجم، به‌ترتیب به‌میزان ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، میزان رشد ویژه کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت‌دارد. در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۷)، اثرات‌هورمون EE_2 برشاخص‌های رشدگربه‌ماهیان زردجوان (*Pelteobagrus fulvidraco*) مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه در این آزمایش، میزان رشد ویژه گربه ماهیانی که در معرض هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول قرارگرفتند نسبت به گروه‌شاهد، بیش‌تر مشاهده شد، ولی با افزایش‌غلظت هورمون EE_2 در گروه سوم، میزان رشد ویژه گربه‌ماهیان کاهش یافت. نتایج مربوط به‌میزان رشدویژه این آزمایش‌نیز با نتایج‌مطالعه‌حاضر مطابقت دارد. در یک مطالعه موردی دیگر، ناجی و همکاران (۱۳۸۸)، اقدام به ماده‌سازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به وسیله هورمون ۱۷آلفا اتینل استرادیول نمودند. نتایج این آزمایش نیز نشان‌داد‌که افزایش جذب هورمون EE_2، به‌طور چشمگیری ($P<0/05$) سبب افزایش میزان رشد ویژه ماهیان نسبت به گروه شاهد می‌گردد. از طرفی‌در ماهیان گروه سوم که زمان‌بیش‌تری‌در معرض این هورمون قرار گرفته بودند نسبت به ماهیان گروه دوم، رشد کم‌تری مشاهده شد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

ارزیابی شاخص‌های خونی: ارزیابی شاخص‌های خونی، یکی از ابزارهای کلیدی در بررسی وضعیت سلامت موجودات آبزی محسوب می‌گردد، با این وجود به‌دلیل برخی عوامل داخلی و خارجی، ممکن است سخت انجام گردد (Satheeshkumar و همکاران، ۲۰۱۲؛ DalBo و همکاران، ۲۰۱۵). براساس مطالعه Fernandes و Mazon (۲۰۰۳)، پارامترهای هماتولوژی ماهی، ارتباط نزدیکی با عوامل محیط زیستی و بیولوژیکی دارند. تغییرات فیزیولوژیکی می‌توانند حاصل یک استرس محیطی باشند و تعدادی از شاخص‌های هماتولوژیکی برای شناسایی این شرایط استفاده می‌گردند. هم‌چنین برطبق مطالعات Adam و همکاران(۱۹۹۶)،اندازه‌گیری پارامترهای‌خونی به‌عنوان یک ابزار برای نظارت بر وضعیت بیولوژیکی‌ماهی درپاسخ به تغییرات‌مرتبط با تغذیه، کیفیت آب و بیماری‌ها استفاده می‌گردد.در مطالعه حاضر، مشاهده گردید که تغییرات معنی‌داری ($P<0/05$) در پارامترهای خونی فرشته ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون ۱۷آلفا اتینیل استرادیول ایجاد شد. این تغییرات به‌صورت افزایشی، در میزان گلبول‌های قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (Ht) ماهیانی که از دو سطح ۲/۵ و ۵ میکروگرم هومورن EE_2 تغذیه کرده بودند نسبت به گروه شاهد مشاهده شدند. هم‌چنین به‌غیر از میانگین‌حجم گلبول‌های قرمز(MCV)، افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) نیز در میان شاخص‌های خونی دیگر از قبیل میزان هموگلوبین خون، میانگین هموگلوبین گلبول(MCH)ومیانگین‌غلظت‌هموگلوبین گلبول (MCHC) در بین گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. تعداد گلبول‌های قرمز و در نتیجه، میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین برحسب فصل، دما، وضعیت تغذیه، بهداشت ماهی و حتی در زمان‌رسیدگی‌جنسی و فعالیت تخم‌ریزی، متفاوت هستند (ستاری، ۱۳۸۵).هم‌چنین، تعدادبی‌شماری‌ازمطالعات‌که‌تغییرات‌درشاخص‌های خون‌شناسی را ثبت کرده است، وابسته به گونه ماهی، سن و چرخه رسیدگی جنسی می‌باشند (Hrubec و همکاران، ۲۰۰۱؛ Vazquez و Guerrero، ۲۰۰۷). علاوه‌براین،تغییرات‌در پارامترهای خونی و پلاسما می‌تواند به‌دلیل چرخه‌های فیزیولوژیکی طبیعی ماهی و محرک‌های محیطی باشد (Luscova، ۱۹۹۸؛ Hrubec و همکاران، ۲۰۰۱). در بسیاری از مطالعات نیز به این موضوع اشاره شده است که تفاوت در شاخص‌های‌خونی و پلاسمای‌ماهیان درپاسخ به‌القاءهورمونی می‌تواند ریشه در اختلاف گونه‌ای، نوع و مقدار هورمون، رسیدگی جنسی ماهی وحساسیت‌ماهی به استرس‌های‌تزریق‌داشته باشد (Luskova، ۱۹۹۸؛ Hrubec و همکاران، ۲۰۰۱؛ Oner و همکاران، ۲۰۰۸؛ Balabanova و همکاران، ۲۰۰۹). با درنظرگرفتن شرایط یکسان محیط نگه‌داری

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

فرشته ماهیان در هر سه گروه آزمایشی و با توجه به ارزیابی نتایج به‌دست آمده، به‌نظر می‌رسد یک رابطه بین القاء هورمونی، اندازه ماهیان و تغییرات پارامترهای خونی وجود دارد. در این مطالعه، اغلب پارامترهای خونی ماهیان تغذیه شده با ۲/۵ میکروگرم هورمون EE_2 در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری داشتند. هم‌چنین کم‌ترین میزان پارامترهای خونی، مربوط به ماهیان گروه شاهد بود. از طرفی، همان‌طورکه قبلاً اشاره شد فرشته ماهیان تغذیه شده با ۲/۵ میکروگرم هورمون EE_2 دارای بیش‌ترین میزان رشد ویژه در مقایسه با گروه‌های دیگر بودند. درحالی‌که کم‌ترین رشد ویژه در ماهیان گروه شاهد نیز مشاهده شد. ذکر این نکته لازم است که تغییرات در پارامترهای خونی ماهیان که در مراحل مختلف زندگی و جنسی اتفاق می‌افتد، فرآیندهای بیوشیمیایی در متابولیسم بدن را انعکاس می‌دهند (Oner و همکاران، ۲۰۰۸). در بسیاری از مطالعات، ثابت شده است که سطوح RBC و Hb در ماهیان همراه با افزایش طول و سن، تمایل به زیاد شدن دارند (Clarks و همکاران، ۱۹۷۹؛ Ikechukwu و Obinnaya، ۲۰۱۰؛ Ejraei و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین، تفاوت در سطوح Ht و Hb می‌تواند در نتیجه تغییر در حجم پلاسما یا اریتروسیت‌ها باشد (Sandstorm، ۱۹۸۹). Orun و Erdeml (۲۰۰۲)، در مطالعه‌ای بر پارامترهای خونی سیاه ماهی (*Capoeta trutta*)، به این نتیجه رسیدند که افزایش در متغیرهای وزن، طول و سن سبب افزایش میزان Hb، RBC، MCHC و WBC خون می‌گردد. در مطالعه‌ای که توسط Baghizadeh و Khara (۲۰۱۴) درخصوص ارزیابی پارامترهای خونی ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در شرایط سنی مختلف و القاء هورمونی انجام گردید، مشاهده شد که با افزایش اندازه ماهی و نیز با تزریق عصاره هیپوفیز یا GnRH، تغییرات رو به افزایشی در پارامترهای RBC، WBC، MCH و MCHC اتفاق می‌افتد. هم‌چنین، در مطالعه Gupta و همکاران (۲۰۱۲)، تمامی پارامترهای خونی ماهیان کپور هندی (*Labeo boga*) و (*Labeo bata*) با بزرگ‌تر شدن اندازه بدن، افزایش یافت. علاوه براین، در مطالعه Balabanova و همکاران (۲۰۰۹)، افزایش میزان WBC در پاسخ به القاء هورمون سنتتیک دگزامتازون فسفات در ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گزارش گردید. هم‌چنان‌که در این مطالعه نیز مشاهده شد، فرشته ماهیان تحت تأثیر هورمون EE_2 نسبت به گروه شاهد دارای رشد بیش‌تری بودند که به‌دنبال آن افزایش در پارامترهای RBC، WBC، هموگلوبین، درصد هماتوکریت، MCH، MCHC و میزان هموگلوبین خون مشاهده شد. به‌دلیل وجود مطالعات اندک انجام شده درخصوص اثرات هورمون‌های استروئیدی بر پارامترهای خونی ماهیان، مقایسه نتایج این مطالعه با دیگر گونه‌های جانوری دشوار است، اگرچه برخی شباهت‌ها می‌تواند بین آن‌ها قابل توجه باشند. در مطالعات محدودی که تاکنون درخصوص اثرات هورمون ۱۷آلفا اتینیل استرادیول بر انواع گونه‌های جانوری انجام گردیده است، تغییرات معنی‌دار پارامترهای خونی مشاهده شده است. در مطالعه Toryila و همکاران (۲۰۱۴)، از قرص‌های محتوی ۱۷آلفا اتینیل استرادیول جهت بررسی تغییرات پارامترهای خونی در خرگوش‌های ماده استفاده گردید. نتایج در این مطالعه نشان داد که میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در گروه‌های خرگوش تغذیه شده با قرص‌های حاوی ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول در مقایسه با گروه شاهد، کاهش چشمگیری دارند که با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش مطابقت ندارد. هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Abbas (۲۰۱۸) درخصوص اثرات هورمون ۱۷آلفا اتینیل استرادیول بر تغییرات پارامترهای خونی بانوان انجام گرفت، به‌غیر از افزایش معنی‌دار میزان هموگلوبین خون، تغییری در پارامترهای دیگر از قبیل میزان گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و درصد هماتوکریت مشاهده نگردید. در ارتباط با شرایط فیزیولوژیکی ماهی، تغییرات خون‌شناسی می‌توانند بین جانوران گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه اتفاق بیافتد (Mahajan و Dheer، ۱۹۷۹). با این وجود، با توجه به این‌که اطلاعات اندکی در خصوص اثرات هورمون EE_2 بر پارامترهای خونی ماهیان وجود دارند پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیش‌تری در گونه‌های دیگر ماهیان نیز انجام گردد.

با وجود عملکرد موفق کاربرد هورمون‌های سنتتیک و طبیعی جهت تولید جمعیت ماهیان تک جنسی در صنعت آبزی‌پروری، به هر حال بایستی تمامی پیش‌بینی‌های لازم جهت جلوگیری از آسیب‌های احتمالی به تولیدکنندگان ماهی، مصرف‌کنندگان و محیط زیست آبی را مدنظر قرار داد. برای مثال استفاده بیش از حد هورمون یا زمان‌های طولانی غیرضروری در معرض‌گذاری، می‌تواند سبب اخلال در رشد، ایجاد نواقص شکلی، انحراف در برنامه هدف‌گذاری تولید ماهیان تک جنسی و در نهایت عدم گرفتن نتیجه دلخواه شود (Bud و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین، استفاده بی‌رویه از هورمون‌های استروژنی می‌تواند باعث ایجاد نگرانی‌هایی درخصوص سلامت مصرف‌کنندگان شود، مخصوصاً در مواقعی که از این هورمون‌ها به‌صورت مستقیم در گروه ماهیان هدف، جهت پرورش و ورود به بازار استفاده می‌گردد. در حال حاضر، در بسیاری از کشورهای اروپایی، از استفاده مستقیم هورمون‌های استروژنی توسط تولیدکنندگان در ماهیان پرورشی جلوگیری به‌عمل می‌آید، درحالی‌که استفاده از این موادبرای مولدین بلامانع است (Bud و همکاران، ۲۰۱۵). در پایان اگرچه لازم است مطالعات بیش‌تری در خصوص اثرات احتمالی منفی و یا مثبت استروژن‌ها بر انواع پارامترهای رشد و شاخص‌های خونی در ماهیان مختلف انجام گردد، با این وجود، به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر به‌طور هم‌زمان اثرات منفی و مثبت

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

استفاده از سطوح مختلف هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول در فرشته ماهیان مشاهده شد.با این توضیح که استفاده به‌صورت محدودو حساب شده از این هورمون می‌تواند باعث افزایش رشد و سرعت بخشیدن به توسعه گنادی گردد (گروه دوم آزمایش)، درحالی‌که با افزایش بیش از حد این هورمون، اثرات منفی بر انواع شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فرشته ماهیان پدیدار شد (گروه سوم آزمایش).

منابع

۱. **ستاری، م.، ۱۳۸۹.** ماهی‌شناسی (۱) (تشریح و فیزیولوژی). انتشارات حق‌شناس. ۶۶۲ صفحه.

۲. **ناجی، ط.؛ نجات‌خواه‌معنوی، پ. و رزمی، ک.، ۱۳۸۸.** بررسی کاربرد هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول در ماده‌سازی ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست. سال ۱۱، شماره ۳، صفحات ۲۹۵ تا ۳۰۲.

۳. **هدایتی، ع.؛ جهانبخشی، ع.؛ مرادزاده، م. و جوادی موسوی، م.، ۱۳۹۳.** تأثیر سمیت تحت کشنده نانواکسید روی (ZnO NPs) بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال ۲، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۳.

4. **Abbas, T.F., 2018.** Contraceptive effects in hematological and biochemical parameters of healthy woman at Al Samawah city. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. Vol. 8, No. 2, pp: 389-395.

5. **Adams, S.M.; Ham, K.D.; Greeley, M.S.; LeHew, R.F.; Hinton, D.E. and Saylor, C.F., 1996.** Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 53, pp: 2177-2187.

6. **Ali, M.; Nicieza, A. and Wootton, R.J., 2003.** Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. Fish and Fisheries. Vlo. 4, No. 2, pp: 147-190.

7. **Angus, R.A.; Stanko, J.; Jenkins, R.L. and Watson, R.D., 2005.** Effects of 17α-ethynylestradiol on sexual development of male western mosquitofish (*Gambusia affinis*). Journal of Comparative Biochemistry and Physiology- part C. Vol. 140, pp: 9-330.

8. **Aris, A.Z.; Shamsuddin, A.S. and Praveena, S.M., 2014.** Occurrence of 17α- ethynylestradiol (EE_2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environmental international. Vol. 69, pp: 104-119.

9. **Baghizadeh, E. and Khara, H., 2014.** Variability in hematology and plasma indices of common carp *Cyprinus carpio*, associated with age, sex and hormonal treatment. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 14, No.1, pp: 99-111.

10. **Balabanova, L.V.; Mikryakov, D.V. and Mikryakov, V.R., 2009.** Response of commom carp (*Cyprinus carpio* L.) Leucocytes to hormone-induced stress. Ecological Physiology and Biochemistry. Vol. 2, No. 1, pp: 86-88.

11. **Baoshan, L.; Jiying, W.; Yu, H.; Tiantian, H.; Shixin, W.; Bingshan, H. and Yongzhi, S., 2019.** Effects of replacing fish oil with wheat germ oil on growth, fat deposition, serum biochemical indices and lipid metabolic enzyme of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*). Aquaculture. Vol. 505, pp: 54-62.

12. **Bartelt-Hunt, S.; Snow, D.D.; Damon-Powell, T. and Miesbach, D., 2011.** Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste facilities. Journal of ContaminantHydrology. Vol. 123, pp: 94-103.

13. **Batt, J.; Bennett-Steward, K.; Couturier, C.; Hammell, L.; Harvey-Clark, C.; Kreiberg, H. and Stevens, D., 2005.** CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Canada. pp: 1-84.

14. **Brummer, T.P., 2007**. Comparative immunological effects of a natural estrogen (17 β- estradiol) versus a pharmacologic synthetic estrogen (17 α- ethinylestradiol). Thesis of master of science in biomedical and veterinary sciences. Blacksburg, Virginia. pp:1-144.

15. **Budd, A.M.; Banh, Q.Q.; Domingos, J.A. and Jerry, D.R., 2015.** Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. Journal of Marine Science and Engineering. Vol. 3, pp: 329-355.

16. **Carvalho, C.V.A.; Passini, G.; Costa, W.M.; Vieira, B.N. and Cerqueira, V.R., 2014.** Effect of estradiol 17β on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus undecimalis*). Acta Scientiarum Animal Sciences. Vol. 36, No. 3, pp: 239-245.

17. **Chen, Y.; Li, M.; Yuan, L.; Xie, Y.; Li, B.; Xu, W.; Meng, F. and Wang, R., 2017.** Growth, blood health, antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to α-ethinylestradiol (EE_2). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 69, pp: 1-5.

18. **Clarks, S.; Whitmore, D.H. and McMahon, R.F., 1979**. Consideration of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Journal of Fish Biology. Vol. 14, pp: 147-154.

19. **Colman, J.R.; Baldwin, D.; Johnson, L.L. and Scholz, N.L., 2009.** Effects of the synthetic estrogen, 17α-ethinylestradiol, on aggression and courtship behaviour in male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology. Vol. 91, pp: 46-54.

20. **Cowey, C.B.; Pope, J.A.; Andron, J. and Blair, A., 1973.** Studies on the nutrition of marine flat fish. The effect of oral administration of diethylstilbesterol and cyrohepta diene on the growth of *Pleuronectes platessa*. Marine Biology. Vol. 19, pp: 14-20.

21. **DalBo, G.A.; Sampaio, F.G.; Losekann, M.E.; Queiroz, J.F.; Luiz, A.J.B.; Wolf, V.H.G.; Goncalves, V.T. and Carra, M.L., 2015.** Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. Neotropical Ichthyology. Vol. 13, No. 2, pp: 439-446.

22. **Degani, G., 1986.** Effect of dietary 17- estradiol and 17-a-methyltestosterone on growth and body composition of slow growing elvers, *Anguilla anguilla* (L.). Comparative Biology and Physiology. Vol. 2, pp: 243-247.

23. **Degani, G.; Boker, R.; Gal, E. and Jackson, K., 1997.** Oogenesis and steroid profiles during the reproductive cycle of female angelfish *Pterophyllum scalare* (Cichlidae). Indian Journal of Fisheries. Vol. 44, No. 1, pp: 1-10.

24. **Des Mes, T.; Zeeman, G. and Lettinga, G., 2005.** Occurance and fate of estrone, 17β-estradiol and 17 α-ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. Environmental Science Biotechnology. Vol. 4, pp: 275-311.

25. **Dussault, È.B.; Balakrishnan, V.K.; Borgmann, U.; Solomon, K.R. and Sibley, P.K., 2009.** Bioaccumulation

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (Salmo trutta). Aquatic Toxicology. Vol. 90, pp: 188-196.

40. **Kuster, M.; de Alda, M.J. and Barceló, D., 2005.** Estrogens and progestrogens in wastewater, sludge- sediments and soil. Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 5, pp: 1-24.

41. **Labadie, P. and Hill, E.M., 2007.** Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry, Comparison of tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry. Journal of Chromatography. Vol. 1141, pp: 74-81.

42. **Laganà, A.; Bacaloni, A.; Fago, G. and Marino, A., 2000.** Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. Vol. 14, pp: 1-7.

43. **Lai, K.M.; Johnson, K.L.; Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N., 2000.** Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. Environmental Science Technology. Vol. 34, pp: 1-4.

44. **Li, J.; Jiang, L.; Liu, X. and Lv, J., 2013.** Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil- water system. International Biodeterior Biodegrad. Vol. 76, pp: 3-7.

45. **Lima, D.L.D.; Schneider, R.J. and Esteves, V.I., 2012.** Sorption behaviour of EE_2 on soils subjected to different long-term organic amendments. Science Total Environmental. Vol. 423, pp: 1-4.

46. **Liu, J.; Wang, R.; Huang, B.; Lin, C.; Zhou, J. and Pan, X., 2012.** Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. Environmental Pollution. Vol. 162, pp: 325-331.

47. **Luskova, V., 1998**. Factors affecting hematological indices of free living fish populations. Acta Veterinaria Brno. Vol. 67, pp: 249-255.

48. **Mahajan, C.L. and Dheer, J.M.S., 1979.** Autoradiography and differential hemoglobin staining as aids to the study of fish hematology. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 35, No. 6, pp: 834-835.

49. **Matty, A.J. and Cheema, I.R., 1978.** The effect of some steroid hormones on the growth and protein metabolism of Rainbow trout. Aquaculture. Vol. 14, pp: 163-178.

50. **Mazotto, V.; Gagné, F.; Marin, M.G.; Ricciardi, F. and Blaise, C., 2008.** Vitellogenin as a biomarker of exposure toestrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. Environmental International. Vol. 34, pp: 31-45.

51. **Noppe, H.; Verslycke, T.; DeWulf, E.; Verheyden, K.; Monteyne, E. and Caeter, P.V., 2007.** Occurence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2- year survey. Ecotoxicological Environmental Safety. Vol. 66, pp: 1-8.

52. **Oner, M.; Atli, G. and Canli, M., 2008.** Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 27, pp: 360-366.

53. **Orn, S.; Holbech, H.; Madsen, T.H.; Norrgren, L. and Petersen, G.L, 2003.** Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethynylestradiol and methyltestosterone. Aquatic toxicology. Vol. 65, pp: 397-411.

54. **Ortega-Salas, A.A.; Cortes, I. and Reyes-Bustamante, H., 2009.** Fecundity, growth and survival of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae) under laboratory conditions. Revista de Biologia Tropical. Vol. 57, No. 3, pp: 741-747.

ofthe synthetic hormone 17α-ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomustentans* and *Hyalella azteca*. Ecotoxicolgy Environmental Safety. Vol. 72, pp: 35-41.

26. **Ejraei, F.; Ghiasi, M. and Khara, H., 2015.** Evaluation of hematological and plasma indices in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, with reference to age, sex, and hormonal treatment. Archives of Polish Fisheries. Vol. 23, pp: 163-170.

27. **Feng, Y.; Zhang, Z.; Gao, P.; Su, H.; Yu, Y. and Ren, N., 2010.** Adsorption behaviour of EE_2 (17 α-ethinylestradiol) onto the inactivated sewage sludge: Kinetic, thermodynamics and influence factors. Journal of Hazard Mater. Vol. 175, pp: 1-6.

28. **Fernandes, M.N. and Mazon, A.F., 2003.** Environmental pollution and fish gill morphology. Fish adaptations. Enfield Sciences Publishers. pp: 203-231.

29. **Gupta, K.; Raina, S.; Sachar, A. and Gupta, K., 2012**. Age and size related variations in haematological parameters of *Labeo boga* and *L. bata*. Biosciences Biotechnology Research Asia. Vol. 9, No. 1, pp: 437-440.

30. **Hallgren, P.; Martensson, L. and Mathiasson, L., 2009.** Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish plasma- a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. International Journal of environmental Analytical Chemistry. Vol. 89, pp: 1023-1042.

31. **Hendry, C.; Martin-Robichaud, D.J. and Benfey, T., 2003.** Hormonal sex reversal of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture. Vol. 219, No. 1, pp: 769-781.

32. **Hrubec, T.C. and Smith, S.A., 2010.** Hematology of fishes. Schalm's veterinary hematology. Wiley-Blackwell. pp: 994-1003.

33. **Hrubec, T.C.; Smith, S.A. and Robertson, J.L., 2001.** Age related in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Veterinary Clinical Pathology. Vol. 30, pp: 8-15.

34. **Ikechukwu, O.A. and Obinnaya, C.L., 2010.** Haematological profile of the African lungfish, *Protopterus annectens* (Owen) of Anambra River, Nigeria. Journal of American Sciences. Vol. 6, pp: 123-130.

35. **Iranshahi, F.; Faramarzi, M.; Kiaalvandi, S.; Jalaee, M.H. and Dehghan, M., 2011.** Effectiveness of Edta in mobilizing of the contaminant metal ions, especially cadmium from tissue of angelfish (*Pterophyllum scalare schultze*) subjected to chronic poisoning with cadmium acetate. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. Vol. 11, No. 4, pp: 519-527.

36. **Juarez, V.J.; Vazquez, J.P.A.; Estrada, C.A.; Ramirez, J.A.M. and De la Tore, R.M., 2017.** Feminization by 17 α- Ethinylestradiol of the progeny of XY-female nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Effects on growth, condition factor and gonadosomatic index. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 17, pp: 599-607.

37. **Kasiri, M.; Farahi, A. and Sudagar, M., 2012.** Growth and reproductive performance by different feed types in fresh water angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). Veterinary Research Forum. Vol. 3, No. 3, pp: 175-179.

38. **Khara, H.; Falahatkar, B. and Meknatkhah, B., 2013.** Effect of dietary estradiol 17β on growth, hematology and biochemistry of stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. World Journal of fish and Marine Sciences. Vol. 5, No. 2, pp: 113-120.

39. **Körner, O.; Kohno, S.; Schönenberger, R.; Suter, M.J.F.; Knauer, K. and Guillette, J.L.J., 2008.** Water temperature and concomitant waterborne ethynylestradiol exposure

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

55. **Orun, I. and Erdeml, A.U., 2002.** A study on blood parameters of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). Journal of Biological Sciences. Vol. 2, pp: 508-511.

56. **Pawlowski, S.; Van Aerle, R.; Tyler, C.R. and Braunbeck, T., 2004.** Effects of 17α-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. Ecotoxicology Environmental Safety. Vol. 57, pp: 30-45.

57. **Peters, R.E.M.; Courtenay, S.C.; Hewitt, M.L. and Maclatchy, D.L, 2010.** Effects of 17 α-ethynylestradiolon early-life development, sex differentiation and vitellogenin induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Marine Environmental Researches. Vol. 69, pp: 86-178.

58. **Piferrer, F., 2001.** Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture. Vol. 197, No. 1-4, pp: 229-281.

59. **Saaristo, M.; Craft, J.A.; Lehtonen, K.K. and Lindström, K., 2009.** Sand goby (*Pomatoschistus minutus*) males exposed to an endocrine disrupting chemical fail in nest and mate competition. Hormonal Behavior. Vol. 56, pp: 35-321.

60. **Sandstrom, O., 1989.** Seasonal variations in some bloodparameters in perch (*Perca fluviatilis* L.). Journal of Application Ichthyology. Vol. 5, pp: 80-84.

61. **Satheeshkumar, P.; Ananthan, G.; Senthilkumar, D.; Khan, A.B. and Jeevanantham, K., 2012**. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. Comparative Clinical Pathology. Vol. 21, pp: 275-281.

62. **Shelar, G.; Shelar, P. and Singh, H.D., 2014**. Angelfish nutrition, reproduction and farming. Lap Lambert Academic Publishing. Germany. pp: 1-64.

63. **Tomšíková, H.; Aufartová, J.; Solich, P.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. and Nováková, A., 2012.** Highsensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. Trends Analytical Chemistry. Vol. 34, pp: 35-58.

64. **Torylia, J.E.; Amadi, K.; Odeh, S.O.; Adelaiye, A.B.; Egesie, U.G. and Achie, L.N., 2014.** Dynamics of combined oral contraceptive: a study of some haematological parameters in female Wistar rats. IOSR Journal of Pharmacy. Vol. 4, No .9, pp: 15-19.

65. **Vazquez, G.R. and Guerrero, G.A., 2007.** Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue Cell. Vol. 39, pp: 151-160.

66. **Wang, H.; Gao, Z.; Beres, B.; Ottobre, J.; Wallat, G.; Tiu, L.; Rapp, D.; O'bryant, P. and Yao, H., 2008.** Effects of estradiol-17β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture. Vol. 285, No. 1-4, pp: 216-223.

67. **Yan, Z.; Lu, G.; Liu, J. and Jin, S., 2012.** An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. Ecotoxicology Environmental Safety. Vol. 84, pp: 34-40.

68. **Ying, G.G.; Kookana, R.S. and Ru, Y.J., 2002.** Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. Environmental International. Vol. 28, pp: 45-51.

69. **Zar, J.H., 1984**. Biostatistical analysis. (2nd ed.) Englewood Cliffs. Prentice Hall, New Jersey, USA. 718 p.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131160

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Effects of 17α-ethinylestradiol (EE2) on growth indices and hematological parameters in fresh water angelfish (*Pterophyllum scalare*)

- **Mohammad Hossain Naseri:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and natural resources, Gorgan, Iran
- **Mohammad Reza Imanpour*:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and natural resources, Gorgan, Iran
- **Valiollah Jafari:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and natural resources, Gorgan, Iran
- **Omid Safari:** Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Received: August 2019 Accepted: November 2019

Key words: 17α-ethinylestradiol, Freshwater angelfish, Growth indices, Hematological parameters

Abstract

Due to the high stability properties of estrogenic compounds, most of them accumulate in aquatic organisms. This feature can directly or indirectly affect the growth rate of aquatic animals. The purpose of this study was to determine the possible effects of 17-alpha-Ethinyl estradiol on growth indices and blood parameters in freshwater Angelfish. According to this, accidentally 63 specimen's angel fish with a mean weight 4.31± 0.46 divided equally to 3 groups in three replicates. EE_2 not used in the control group, while for second and third groups the amount 2.5 and 5 $\mu g kg^{-1}$ used respectively that in which combined the ethanol evaporation method. The angelfishes feed two times a day to the fullest extent. In this experiment, significant increasing ($P< 0.05$) observed to the specific growth rate (SGR) (0.22 % per day) and condition factor (1.76) in second group angelfishes than other groups. Also, significant variations ($P< 0.05$) performed to hematological indices in angelfishes that feed to different levels of EE_2. This variations was increasingly the amounts that red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), blood hemoglobin level, Mean corpuscular hemoglobin (MCH), Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in second and third groups than control group, respectively. Evaluate of results in this study shows that limit using of EE_2 hormone can result in growth increasing in angelfishes.

* Corresponding Author's email: imanpoor@gau.ac.ir