Arshive of SID

بررسی اثر ٤- نونیل فنل بر شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادو سوماتیک و تغییرات سطوح پلاسمائی IgM و فعالیت لیزوزیم در ماهی نابالغ ایمونوگلوبولین کپورکوی *(Cyprinus carpio)*

همایون حسین‌زاده صحافی*[۱]، پریسا امانی‌نژاد[۲]، مهدی سلطانی[۳]

۱-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۲-گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵

۳-گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۹۹۶۳۱۱

تاریخ دریافت: ۲۹ دی ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۰ خرداد ۱۳۹۶

چکیده

در این بررسی تاثیر ۴- نونیل فنل بر شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادوسوماتیک و تغییرات سطوح پلاسمائی IgM و فعالیت لیزوزیم پلاسمای خون ماهیان نابالغ نر وماده کپورکوی بررسی شد. بدین منظور ماهیان درخلال سه هفته به صورت تزریق درون صفاقی دوزهای۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل و ۲ میکروگرم ۱۷-بتااسترادیول به ازای هرگرم وزن بدن دریافت نمودند. از ماهیان در روزهای ۰ و ۲۲ نمونه‌برداری به عمل آمد. به منظور اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین (IgM) ازروش پیشنهاد شده Anderson و Siwicki و فعالیت لایزوزیم با استفاده از روش الایزا تعیین شد. شاخص‌های کبدی (HIS) و تخمدانی (GSI) در جنس ماده و شاخص کبدی (HIS) در جنس نر با استفاده از روش Han- Htun تعیین شد. نتایج این بررسی نشان داد که میزان سطوح ایمونوگلوبولین ام در غلظت۵۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل (۵۵/۶۶±۲/۵۱) در جنس ماده و (۵۹±۲/۰۱) در جنس نرو نیز در تیمار۱۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل (۵۳±۲/۰۱) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌کنترل داشت (P<۰/۰۵). اما میزان سطوح ایمونوگلوبولین ام درغلظت ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل و ۲ میکروگرم ۱۷-بتااسترادیول کاهش معنی‌داری در مقایسه با غلظت ۱۰و۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن ۴- نونیل فنل داشت. میزان فعالیت لایزوزیم نیز در تیمار ۵۰ میکروگرم ۴- نونیل فنل (۳۳±۲/۰۸ /۶۴) در جنس ماده و(۲/۵۱ ± ۶۲/۶۶) در جنس نر به طور معنی‌داری افزایش یافت.اما در بالاترین غلظت ۴- نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم برگرم) و تیمار ۱۷-بتااسترادیول به طور معنی داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. همچنین تغییرات شاخص کبدی و تخمدانی در جنس ماده و و نر مشاهده شد.نتایج این بررسی نشان دادکه شبه استروژن‌هایی نظیر ۴-نونیل فنل می‌تواند باعث اختلالات ایمونولوژیکی درماهیان شده، سیستم ایمنی را سرکوب و از طریق فعالیت استروئیدهای جنسی و تعادل ایمنی، ماهیان را مستعد پذیرش انواع بیماری‌ها نماید وخطر ابتلا به بیماری را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: ۴- نونیل فنل، ایمونوگلوبولین (IgM)، لیزوزیم، شاخص هپاتوسوماتیک، شاخص گنادوسوماتیک، کپورکوی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). h_hosseinzadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Arshive of SID

مقدمه

در دهه‌های گذشته، تأثیرات صنعتی شدن، کشاورزی متمرکز و توسعه شهری منجر به بروز مشکلات جدی آلودگی در اکوسیستم‌های دریائی شده است. امروزه به اثبات رسیده است که مواد آلاینده موجود در دریا، پیامدهای ناگوار مختلفی در سطح‌فرد، جمعیت و اکوسیستم دارند و بر عملکرد اندام‌ها، وضعیت تولید مثل، اندازه جمعیت و در نهایت تنوع زیستی تأثیرمنفی می‌گذارند (Arukwe *et al*., 1997). بسیاری از این مواد به طور بالقوه برای موجودات آبزی سمی، ژنوتوکسیک و سرطان‌زا هستند (Berczi and Nagy, 1998). به تازگی این نگرانی به وجودآمده است که آلاینده‌های خاص زیست‌محیطی به اندازه برخی از ترکیبات طبیعی پتانسیل اثرگذاری بر روی سیستم غدد درون‌ریز را که مسئول تنظیم فرآیندهای حیاتی نظیر توسعه، رشد، سوخت و ساز و تولید مثل می‌باشد را دارند. این ترکیبات همچنین باعث ایجاد اثرات منفی در سلامتی یک موجود سالم، فرزندان آن‌و یا در نسل‌های بعدی می‌شوند. یکی‌ازاین ترکیبات که اثر استروژنیک داشته و ژئوتوکسین بودن آن نیز مشاهده شده است (Casini *et al*.,2000). ۴-نونیل‌فنل اتوکسیلات می‌باشد که دارای پتانسیل اختلال در سیستم آندوکرینی موجودات زنده و به‌ویژه‌آبزیان می باشد (Colburn *et al*.,1997). تمامی ترکیبات مختل‌کننده سیستم درون ریز نهایتاً از طریق پساب‌ها وارد اکوسیستم‌های آبی می شوند و بنابراین موجودات آبزی در معرض خطر ترکیبات مختل‌کننده سیستم درون ریز قرار دارند (Tyler *et al*., 1998). استروئیدهای جنسی حساس‌ترین هورمون‌ها در برابر اثر ترکیبات مختل‌کننده سیستمِ درون ریز هستند و برخی از این ترکیبات مانند ۴-نونیل‌فنل از طریق اتصال به گیرنده‌های استروژنی‌در بدن پاسخی مشابه هورمون‌های جنسی استروئیدی ایجاد می‌کنند و سبب ایجاد اختلال در سیستم درون ریز ماهیان می‌شوند (Bjorkblom, 2009). نونیل فنل برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ تولید شد و سپس تولید و افزایش آن به صورت‌تصاعدی افزایش یافت. نونیل فنل در محیط‌های آبی در اثر تجزیه میکروبی نونیل فنل اتوکسیلات به‌وجود می‌آید. نونیل فنل اتوکسیلات‌یک‌آلکیل فنل اتوکسیلات (APEs) و یک سورفاکتانت غیریونی است‌که به طورگسترده در سورفاکتانت‌ها، رنگ‌ها، شوینده‌ها، روغن‌های روان کننده و صنایع شیمیائی و صنعتی یافت می‌شود (Soares *et al*., 2008). به‌طوری‌که میانگین غلظت ترکیب شبه استروژنی ۴- نونیل فنل در عضله و کبد کپورماهی تالاب انزلی به ترتیب ۱/۶۵ و ۳/۰۲ میکروگرم برگرم اندازه‌گیری شد (Mortazavi *et al*., 2012). تحقیقات متعددی نشان می‌دهدکه پروتئین‌های ایمنی ذاتی ممکن است تحت تأثیر ترکیبات استروژنیک قرار گیرند (Moens *et al*., 2006). برخی از این ترکیبات که مؤثر بر فعالیت پروتئین های ایمنی شناخته شده‌اند؛ شامل اتینیل استرادیول، نونیل فنل و بیس فنل آ می‌باشند. Belosevic و Wang (۱۹۹۹) در شرایط invitro نشان دادند که مواجه با استرادیول پاسخ‌های ایمنی را در هموفلاژله‌ها (*Trypanosoma wski*) *danile* تعدیل می کند. علاوه برآن Yamayuchi و همکارانش (۲۰۰۱) در شرایط invitro با استفاده ازغلظت فیزیولوژیکی، نتایج مشابهی را از استرادیول و لکوسیت‌های اولیه در ماهی‌کپور بدست آوردند (Yamayuchi *et al*., 2001). همچنین در بررسی که توسط Hoeger و

www.SID.ir

Arshive of SID

همکارانش (۲۰۰۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با ۱۰ تا ۷۰ درصد فاضلاب گیاهان‌دارویی (شامل پلی آروماتیک هیدروکربن به همراه دیگر آلودگی‌ها) انجام شد، نتایج نشان داد که تعداد گردش لنفوسیت‌ها کاهش یافته، اما ظرفیت تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافته است، علاوه بر آن این فاضلاب به طور قابل توجهی توانست هرعملکرد ایمنی دیگر مانند انفجار تنفسی، فاگوسیتوزیس، فعالیت لایزوزیم، جمعیت لکوسیت‌ها به غیر از لنفوسیت و تولید IgM اختصاصی آئروموناس سالمونسیدا را درستخوش تغییر نماید (Hdeger *et al.*, 2004). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استروژنیک ۴- نونیل فنل بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین‌ام (IgM) و فعالیت لیزوزیم در ماهیان کپورکوی نابالغ بود.

مواد و روش‌ها

تأمین ماهی و دورهٔ سازگاری

این پژوهش در آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، در خرداد ماه ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی کپور کوی نابالغ نر و ماده (*Cyprinus carpio carpio*) با میانگین وزنی (۱۰±۵۰گرم) از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سازمان فنی و حرفه‌ای استان تهران تهیه شدند. ماهیان به صورت تصادفی در ۱۸ آکوآریوم ۲۰ لیتری (۱۰ماهی در هرآکوآریوم) رها سازی شدند. جهت سازگاری ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی قرار گرفتند. آب روزانه به میزان ۸۰ درصد تعویض و فاکتور های فیزیکی و شیمیایی آب (دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ۱۰-۵ ppt و PH=۶/۸) اندازه‌گیری شد. در کل دورهٔ آز مایش هیچ‌گونه غذادهی صورت نگرفت.

تزریق ماهیان

به منظور مواجهه ماهی کپور کوی با ۴-نونیل‌فنل، از روش‌تزریق استفاده شد. بدین منظور پس از بیهوش کردن با ۲-فنوکسی‌اتانول ۰/۱ ٪ (Merc,Germany)، ماهیان ۳ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰میکروگرم بر گرم وزن بدن از ۴- نونیل‌فنل با درجه خلوص۹۵/۳٪ در خلال ۳ هفته و به صورت تزریق درون صفاقی تحت تزریق قرار گرفتند. همچنین‌ماهیان ۱ تیماردوز۲ میکرو گرم بر گرم وزن بدن از ۱۷-بتااسترادیول (Sigma,USA) را به عنوان ژنواستروژن دریافت‌کردند. علت استفاده از ۱۷-بتااسترادیول در این مطالعه آزمون فرضیه اثراستروژنیک نونیل فنل بود. تزریق‌ها به میزان نصف دوز و یکبار در هفته انجام پذیرفت. گروه کنترل حلال تنها میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از حلال (روغن نارگیل+ اتانول) را دریافت کردند، درحالی‌که بر روی ماهیان گروه کنترل هیچ گونه تزریقی صورت نگرفت.

نمونه‌برداری

در روز ۲۲ از ماهیان نمونه‌برداری به‌عمل آمد. جهت نمونه‌برداری، پس از بیهوش نمودن و ثبت طول کل و وزن بدن، از ساقه دمی ماهیان به‌وسیله سرنگ ۲ میلی‌لیتری تیمار شده با هپارین‌خونگیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور g×3000 سانتریفیوژ گشته و پلاسما به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

www.SID.ir

Arshive of SID

سنجش فاکتورهای پلاسمای خون

انـدازه گیری میزان ایمونو گلوبولین ام (IgM) پلاسما:

به منظور اندازه‌گیری میزان‌ایمونوگلوبین‌ام(IgM)از روش پیشنهاد شده Siwickiو Anderson در سال۱۹۹۳ استفاده گردید. روش اندازه‌گیری به این صورت است که IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول تشـکیل‌کمپلکس داده و باعث کدرشـدن محلول می‌شود. میزان‌کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم دارد. در این تحقیق IgM با استفاده ازکیت شـرکت Bioscience ودستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد (Anderson and Siwicki, 1993).

اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزویم پلاسما

به منظور اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم از روش توصیه شده Ellis درسال ۱۹۹۰ استفاده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم به عنوان‌یکی از شاخص‌های ایمنی ذاتی با استفاده از سرم خون و روش جذب نوری به همراه سنجش‌کدورت صورت پذیرفت بدین منظور، در ابتدا ۱۵ میکرولیتر همولنف با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولارسدیم سیترات (pH= ۵/۸) درگوده‌های میکروپلیت تخت ۹۶ خانه‌ای الایزا مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید (Ellis, 1990).

- روش سنجش شاخص های تخمدانی (GSI) وکبدی

بافت های کبد و گناد به منظور محاسبه شاخص کبدی (HSI) و شاخص‌گنادی (GSI)توزین شدند. شاخص‌های HSI و GSI با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

- شاخص گنادی (GSI)

بر اساس فرمول زیر برای هر ماهی در هر تیمار محاسبه گردید،که در آن WG وزن گناد(گرم)و W، وزن کل بدن ماهی (گرم) است (Htun-Han, 1979).

$$GSI= WG / W \times 100$$

- شاخص گنادی (HSI)

بر اساس فرمول زیر برای هر ماهی‌در هر تیمار محاسبه گردید، که در آن W_L وزن کبد (گرم) و W وزن کل بدن ماهی (گرم) است(Htun-Han, 1979).

$$HSI= WG / W \times 100$$

جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS ۱۶ استفاده گردید. تمامی مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است. ابتدا همگن بودن – گروه ها با آزمون پی‌پی پلات مورد ارزیابی قرارگرفت. سپس با توجه به همگن بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین‌تیمارهای آزمایشی از آزمون تجزیه واریانس (One-Way-ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد (Zar, 1999).

نتایج

در طول‌دورهٔ آزمایش‌هیچ گونه تلفاتی در ماهیان مشاهده نشد. نتایج حاصل از پژوهش در مورد اثرات

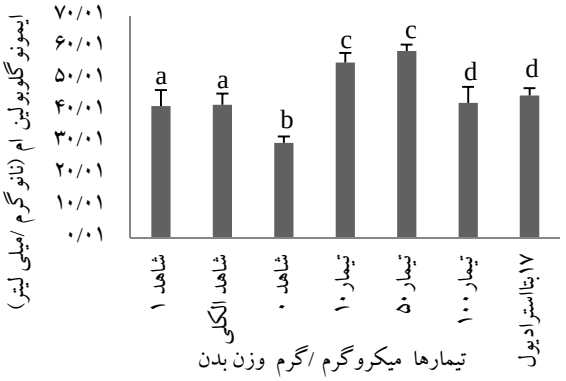
www.SID.ir

Arshive of SID

ماده ۴- نونیل فنل بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین ام (IgM) و فعالیت لیزوزیم در پلاسمای خون‌ماهیان کپور کوی نابالغ بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر پلاسما مورد بررسی قرار گرفت، میزان ایمونوگلوبولین‌ام در غلظت‌های پایین و متوسط نونیل فنل ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم در جنس ماده به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد (جدول ۱)، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم درگرم) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P<0/01$) همچنین میزان IgM در گروه کنترل ۱ (نمونه‌برداری در روز ۲۱)، افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل صفر (نمونه‌برداری در ابتدای دوره) پیدا کرد (شکل ۱).

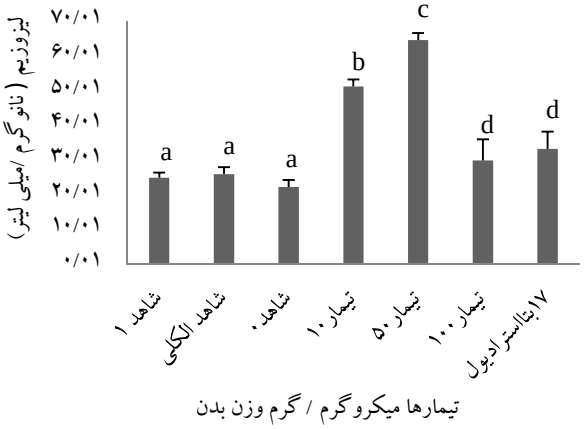
شکل ۱: غلظت ایمونوگلوبولین ام (IgM) پلا سما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتااسترادیول در جنس ماده ماهی کپورکوی(n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

در جنس نر نیز میزان IgM در غلظت های پایین و متو سط نونیل فنل (۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P<0/01$)، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم درگرم) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل در جنس ماده کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۲: غلظت ایمونوگلوبولین ام (IgM) پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتااسترادیول در جنس نر ماهی‌کپورکوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

میزان پروتئین لایزوزیم در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل در جنس ماده افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌کنترل دا شت (جدول ۲)، ولی در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P<0/01$).



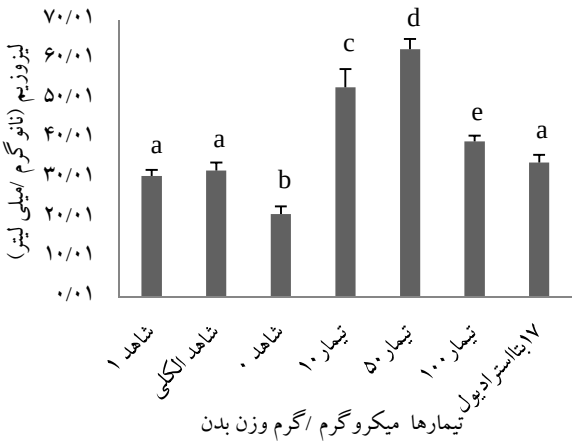
شکل ۳: غلظت پروتئین لایزوزیم پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتااسترادیول در جنس ماده ماهی کپورکوی(n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

www.SID.ir

Arshive of SID

میزان لیزوزیم در تیمار ۱۷-بتااسترادیول (۲ میکروگرم در گرم) اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل داشت. میزان لیزوزیم در گروه کنترل ۱ (نمونه‌برداری روز ۲۱) اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل صفر (نمونه‌برداری در ابتدای دوره) پیدا نکرد (شکل ۳).

در جنس نر نیز میزان پروتئین لایزوزیم در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم افزایش معنی‌داری با گروه کنترل داشت، ولی در تیمار ۱۰۰ میکروگرم درگرم نونیل فنل کاهش معنی‌داری پیدا کرد (P<۰/۰۱). میزان لیزوزیم در تیمار ۱۷-بتااسترادیول (۲ میکروگرم درگرم) اختلاف معنی‌داری با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل داشت (P<۰/۰۱). همچنین میزان میزان لیزوزیم در گروه کنترل۱ (افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ۰ از خود نشان داد (شکل ۴).



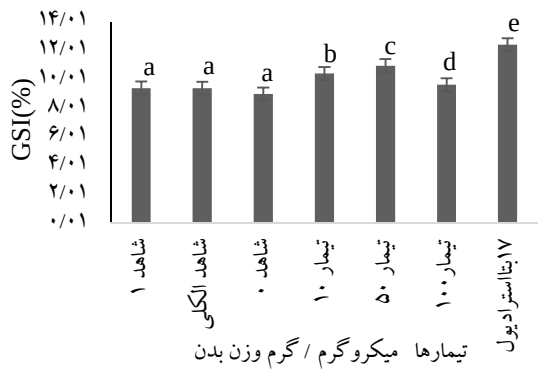
شکل ۴: غلظت پروتئین لایزوزیم پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتااسترادیول در جنس نرماهی کپورکوی(n=۱۰)
حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

بررسی شاخص گنادوسوماتیک (GSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص GSI در جنس ماده در غلظت‌های ۱۰و ۵۰ میکروگرم برگرم نونیل فنل به طور معنی‌داری افزایش یافته، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰میکروگرم بر گرم) کاهش معنی‌داری مشاهده شد (P>۰/۰۱). شاخص GSI در تیمار ۱۷- بتااسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم برگرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل از خود نشان داد (P>۰/۰۱). اختلاف آماری معنی‌داری درمیان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۵).

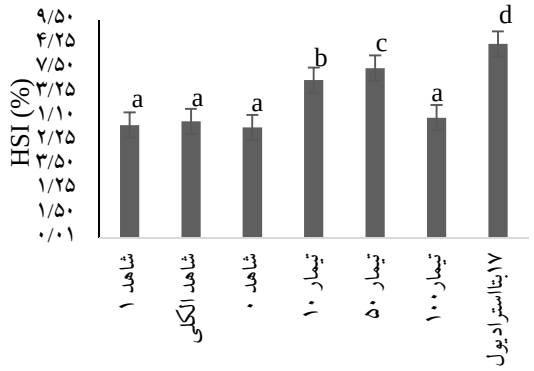
بررسی شاخص‌هپاتوسوماتیک(HSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص HSI در جنس ماده در غلظت‌های ۱۰و۵۰ میکروگرم برگرم نونیل فنل به طور معنی‌داری افزایش یافته، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم برگرم) کاهش معنی‌داری مشاهده شد (P>۰/۰۱). شاخص HSI در تیمار ۱۷-بتااسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم برگرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل وگروه کنترل از خود نشان داد (P>۰/۰۱). اختلاف آماری معنی‌داری در میان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۶). بررسی شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص HSI در جنس نر در غلظت های ۱۰و ۵۰ میکروگرم برگرم نونیل فنل به طورمعنی‌داری افزایش یافته، اما درغلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی‌داری مشاهده شد (P>۰/۰۱). شاخص HSI در تیمار ۱۷- بتااسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم برگرم افزایش معنی‌داری درمقایسه با تیمارهای نونیل‌فنل و گروه کنترل از خود نشان داد (P>۰/۰۱). اختلاف آماری معنی‌داری در میان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۷).

www.SID.ir

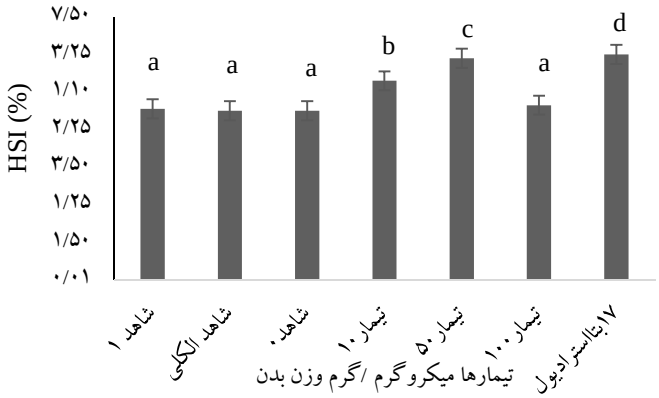
Arshive of SID



شکل ۵: شاخص گنادوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷- بتااسترادیول در جنس ماده ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۶: شاخص هپاتوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷- بتااسترادیول‌درجنس‌ماده‌ماهی‌کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۷: شاخص هپاتوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتااسترادیول در جنس نر ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

بحث

نتایج بد ست آمده در این برر سی ن شان داد که ۴- نونیل فنل به طور قابل توجهی می‌تواند سبب تغییر در شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادوسوماتیک و شاخص‌های ایمنی (IgM، لیزوزیم) در ماهی‌کپورکوی نابالغ شود. سطوح IgM پلا سما و فعالیت لایزوزیم در پاسخ به غلظت متوسط (۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن ۴- نونیل فنل پس از ۲ روز افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. این در حالی بود که در غلظت بالا (۱۰۰ میکروگرم برگرم وزن بدن) ۴- نونیل فنل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و تیمار ۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن دیده شد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که سطوح ایمونوگلوبولین (IgM) پلاسما در جنس نر و ماده ماهی نابالغ کپور کوی در غلظت ۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن ۴- نونیل فنل تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه‌کنترل دارد. این در حالی بود که غلظت ۱۰۰ میکروگرم برگرم وزن بدن ۴- نونیل فنل و غلظت ۲ میکروگرم برگرم وزن بدن ۱۷- بتااسترادیول کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن دیده

www.SID.ir

Arshive of SID

شـد. در ماهیان Ig جزء اصـلی پاسـخ ایمنی هومورال تطبیقی اسـت. این تصـور وجود دارد که در ماهیان تنها یک ایزومر ایمونوگلوبولین به نام IgM وجود دارد IgS درهردو شـکل غشـائی یا محلول در فرآیند جایگزینی mRNA درغشاء لنفوسیت‌های B یافت و می‌توان برای جداسـازی سـلول‌های +Ig و -Ig از آن اسـتفاده نمود. تغییرات در سطوح IgM می‌تواند به عنوان یک شاخص در واکنش با اسـترس وکاهش ایمنی پس از مواجهه با مواد سـمی مورد اسـتفاده‌قرار گیرد (Jobling *et al.*, 1996) .در ماهیان مکانیسـم ایمنی اختصـاصـی و غیراختصاصی سلولار و همولار وجود دارد. پاسخ ایمنی در ماهیان ممکن اسـت به عنوان یک مدل افزایشـی یا جایگزین برای پیش‌بینی سم‌شناسی ایمنی آلودگی‌های محیطی اسـتفاده شـود، به طوری‌که توسـط تعدادی از متخصصین نشان داده شده است (Dias and Maraes, 2007; Witeska, 2010 Tavares-). آلکیل‌فنل۴-نونیل فنل (NP) یک شـبه اسـتروژن اسـت و شـاید یکی از بهترین EDCsهای شناخته شده باشد. NP مهارکننده و ممانعت‌کننده از استقرار لیپوپلی ساکارید (LPS) ناشی ازگرانولوسـیت اتصـال یافته (ND) و تولید TNFα (فاکتور α نکروزدهندهٔ تومور ـــ رسـپتورسـیتوکین) شناخته شده که این مهار شدن به رسپتورهای استروژنی α و β (ERβ - ERα) نسـبت داده شـده که وابسـته به درجه ممانعت‌از فعال شدن NF Kβ (رسپتور سیتوکین که موجب افزایش پاسخ ایمنی-تحریکی از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالی NFKβ) می‌باشد (You *et al.*, 2002). همچنین اسـتروژن نقش مهمی در هموسـتازی خون توسـط تکثیر لنفوسـیت‌های وابسـته دارد، به طوری‌که کاهش میتوژن القائی تکثیر سـلول های T و B در ارتباط‌با افزایش سطوح خونی EDCsها در چندین گونه‌مشاهده شده‌است (Watanaki *etal.*, 2002). Luebke و همکارانش (۱۹۹۷) در تحقیقی نشان دادنـد کـه قرار گرفتن در معرض هیـدروکربن‌هـای-آروماتیـک چنـدحلقـه‌ای منجر بـه کـاهش پـاسـخ تکثیرلنفوسیت در ماهی مداکا می‌شود و تجزیه و تحلیل عمیق‌تر سبب شد که نویسندگان پیشنهاد دهند که اندام هدف در سلول‌های T وجود دارد، زیرا استقرار LPS بر تکثیر سلول‌های B و سلول‌های تشکیل‌دهنده آنتی‌بادی بی‌تـأ ثیر بود (Luebke *et al.*, 1997). در مقـابـل کرئوزوت مایع (۳-۱۰میکرولیتر در لیتر) شـا مل پلی آرو ماتیک هیدروکربن پس از مواجهه با ماهی قزل آلای رنگین‌کمـان منجر بـه کـاهش انفجـار تنفسـی لکوسـیت های سـرکلیه شـد، ا ما افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و نمایان شدن درصدی از سلول‌های +Ig را در زمان کوتاهی به دنبال داشـت. اگرچه پس از گذ شت ۲۸ روز، فعالیت فاگو ستیوزی و انفجار تنفسی به سطح گروه کنترل بازگشت، اما میزان سلول‌های T در همان سطح‌کاهش یافته باقی ماند (Karrow *et al.*, 2001). همچنین در بررسـی که توسـط Hoeger و همکارانش (۲۰۰۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با ۱۰ تا ۷۰ درصـد فاضـلاب گیاهان دارویی (شـا مل پلی‌آرو ماتیک هیدروکربن به همراه دیگر آلودگی‌ها) انجام شـد، نتایج نشـان دادکه تعداد گردش لنفوسیت‌ها کاهش‌یافته، اما ظرفیت تکثیر آنها در شرایط آز مایشـگاهی افزایش یافته‌اسـت، علاوه برآن این فاضلاب به طور قابل توجهی توانست هر عملکرد ایمنی دیگر مانند انفجار تنفسـی، فاگوسـیتوزیس، فعالیت لایزوزیم، جمعیت لکوسـیت‌ها به غیراز لنفوسـیت و تولید IgM اختصـاصـی آئروموناس سـالمونسـیدا را دسـتخوش تغییر نما ید (Hoeger *et al.*, 2004). در

www.SID.ir

Arshive of SID

مقابل تزریق درون صفاقی (ip) روغن دیزل استخراج شده از کف لجن، هیچ تأثیری بر فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) ایجاد نکرد، اما سرم لیزوزیم را سرکوب و تکثیر لنفوسیت‌های سرکلیه را در پاسخ به هماگلوتینین افزایش داد (Tahir and Secombes, 1995). تأثیر استرادیول تعدیل‌یافته بر فعالیت عامل مکمل (کمپلمان)، فعالیت سرم پراکسیداز و IgM در ماهی شانک که توسط Cuesta و همکارانش (۲۰۰۷) بررسی شد، نیز نشان داد که تزریق درون صفاقی (ip) تیمار ۱۷- بتااسترادیول (E_2) موجب افزایش فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) یک روز پس از تزریق و فعالیت سرم پراکسیداز ۳ تا ۷ روز پس از تزریق شد. در این راستا تیمار E_2، فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) و تولید IgM سرم را در آخرین زمان آزمایش سرکوب کرد (Cuesta *et al*., 2008). نتایج این بررسی‌منطبق با سرکوب سنتز IgM و مهار سلول‌های تولید کننده IgM در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد (Hou *et al*., 1999a). همچنین-۱۷بتااسترادیول (E_2) در تعدادی از مطالعات در تکثیر لمفوسیت و تولید IgM نشان داده شده است (Thilagam *et al*., 2009; Suzuki *et al*., 1997; Cook, 1994) و اما دیگر مطالعات عکس این نتایج را بدست آوردند (Hou and Hun, 2001; Hou *et al*., 1999b; Cuesta, 2007). نتایج متناقض نیز برای استروئیدهای جنسی نظیر EDCS ها گزارش شده است. اخیراً در تحقیقی که توسط Yin و همکارانش (۲۰۰۷) صورت گرفت، نتایج نشان داد که بیس فنل آ(BPA) در غلظت ۰/۰۵۴ تا ۵/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر موجب تکثیر لنفوسیت در ماهیان قرمز (*Carassius auratus*) می‌شود. این در حالی است که مواجهه مزمن NP در غلظت ۵ تا ۱۵گرم در لیتر و تزریق اتینل استرادیول در غلظت ۵۰۰ گرم در کیلوگرم‌وزن بدن مقدار کل لکوسیت‌ها را در ماهی کپور معمولی کاهش می‌دهد (Schwaiger *et al*., 2000). با وجود این تناقضات استروژن‌ها و اخلال گران غدد درون ریز شبه استروژنی در اثرگذاری بر تعادل تکثیر در برابر لنفوسیت‌ها دیده شدند.

در ماهیان، لیزوزیم به عنوان یک آنزیم با ویژگی‌های آنتی‌بیوتیکی است که از گلبول‌های سفید آزاد شده و فعالیت بیشتری نسبت به پستانداران دارد و در اکثر موارد به عنوان شاخص عملکرد ایمنی غیر اختصاصی استفاده می شود (Saurabh and Sahoo, 2008). در میزان فعالیت لیزوزیم تحت تأثیر فعالیت محرک‌های ایمنی است، بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش در میزان لیزوزیم، عموماً در نتیجه افزایش‌تعداد سلول‌های بیگانه خواراست که مقدار لیزوزیم سنتز شده در سلول را افزایش می‌دهد (Saha *et al*., 2004). در تأیید این مطالعه تعدادی از پروتئین‌های ایمنی ذاتی به عنوان اندام هدف برای ترکیبات استروژنیک نشان داده شده‌اند. برخی از این ترکیبات که مؤثر بر فعالیت لیزوزیم شناخته شده‌اند؛ شامل اتینیل استرادیول، نونیل فنل و بیس‌فنل‌آ می‌باشند. تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که پروتئین‌های ایمنی ذاتی ممکن است تحت تأثیر ترکیبات استروژنیک قرار گیرند (Moens *et al*., 2006). در تحقیقی که توسط Maule و همکارانش (۲۰۰۵) بر روی ماهیان چارِ قطب جنوب انجام‌شد (*Salvelinu alpinus*) انجام شد، نتایج نشان داد که اختلال در لیزوزیم دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پس از مواجهه با رژیم غذایی پلی‌کلروبی‌فنیل (PCB) به علت کاهش در فعالیت تجزیه‌کنندگی لیزوزیم در موکوس ماهیان چار قطب جنوب می‌باشد. Nakayama

www.SID.ir

Arshive of SID

و همکارانش (۲۰۰۸) نیز تأثیر آلودگی سنگین نفتی (۳۸ گرم در لیتر به مدت ۳ روز) را در ماهی کفشک ژاپنی (*Paralichthy olivaceus*) با استفاده از میکروآرایش cDNA مورد ارزیابی قرار دادند، آنها دریافتند که یک تغییر در ایمنی در ارتباط با ژن‌ها که شامل تنظیم کاهشی در زنجیره سبک ایمونوگلوبولین، CD45، ترکیب ا صلی بافت پیوندی آنتی‌ژن‌های کلاس IIو عامل پیش‌ساز تحریک‌کننده کلونی ماکروفاژ و تنظیم افزایشی در ۸- اینترلوکین و لایزوزیم دیده می‌شود. علاوه بر آن در انکوباسیون خارج سالنی با روغن خالص و پلی آروماتیک هیدروکربن تک حلقه‌ای (PAHs) در پلاسمای ماهی باس در یایی ارو پایی، تغییر معنی‌داری در میزان لیزوزیم و فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) جایگزین به‌وجود آمد (Nakayama *et al.*, 2009). در مطالعه دیگری با استفاده ازآروکلر ۱۲۴۸ در ماهی سرگنده قهوه‌ای (*Ameiurus nebulosus*) کاهش در فعالیت ضد باکتریایی و نیز آنتی‌بادی دیده‌شد (Iwanowicz *et al.*, 2001). ترکیب‌پلی‌کلرو بی فنیل‌ها (آروکلر ۱۲۴۲، ۱۲۵۴، ۱۲۶۰) قادر به تغییر در میزان لیزوزیم و فعالیت ROS در *L. limanda* شد (Iwanowicz *et al.*, 2005). Siwicki و همکارانش (۱۹۹۰) نشان دادند که قرار گرفتن در معرض تری‌کلرو فون باعث کاهش در سطوح لیزوزیم سرم، تکثیر لنفو سیت، انفجار تنفسی و بیگانه خواری درلکوسیت‌های ماهی‌کپور معمولی شد (Siwicki *et al.*, 1990). اما تغییری در تولید آنتی‌بادی های اختصاصی دیده نشد (Cossarini-Dunier *et al.*, 1990). در میان آن هافنل، هیدروکینون پیروکتکول سبب‌کاهش‌در فعالیت‌سیتوتوکسیک سلول‌های واسطه در لنفوسیت‌های طحال، در ماهی‌کپور معمولی شدند (Taysse *et al.*, 1995). علاوه بر آن پنتاکلروفنل باعث کاهش تولید ماکروفاژ سیتوکینز در ماهیان‌طلایی (Goldfish) شد (Chen *et al.*, 2005)، اما فاگوسیتوز فعال شده و عملکردهای ایمنی و مقاومت بیماری‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بدون تغییر باقی ماند (Shelley *et al.*, 2009).به عبارت دیگر تحریک ایمنی اختصاصی تاکنون با تغییر در سطوح استروئیدهای جنسی گزارش شده است. به عنوان مثال سطوح سرم E_2 به طور چشمگیری در عفونت خفیف ماهی سیم دریایی (*Sparu sarba*) کاهش یافته و در سطحی پایین در طول دورهٔ عفونت باقی می‌ماند. همچنین گاهی تغییر در ایمنی اکتسابی در ماهیان تیمار شده با شبه استروژن مشاهده شده است. این اثرات در ابتدا بوسیلهٔ اندازه گیری سطوح آنتی بادی هایی است که به طور اختصاصی در برابر باکتری‌های مختلف آروکلر ۱۲۵۴، تی‌بیتی (TBT) و نونیل‌فنل (NP) که به تنهایی و یا در ترکیب سرکوب شده شنا سایی می شوند(Rice and Xiang, 2000; Iwanowicz *et al.*, 2009). در مجموع تغییرات در عملکرد لکوسیت‌ها، پروتئین‌های مرتبط با ایمنی و آنتی‌بادی‌های تولید شده بوسیلهٔ ژن‌های ژنو ا استروژن‌ها و ژنوآندروژن‌ها باعث می شودکه حیوانات نسبت به‌پاتوژن‌ها بسیار حساس‌تر شوند. مقدار شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) و گنادوسوماتیک (GSI) در جنس ماده در غلظت های ۱۰و۵۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل به طور معنی‌داری افزایش پیداکرد، ا ما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم درگرم) به‌طور معنی‌داری کاهش یا فت. شاخص هپاتوسر ماتیک (HSI)در جنس نر در غلظت‌های۱۰و۵۰ میکروگرم درگرم نونیل فنل به طورمعنی داری افزایش یافت، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰میکروگرم در گرم)

www.SID.ir

Arshive of SID

کاهش یافت و دارای اختلاف آماری معنی‌داری با غلظت های متوسط و پایین نونیل‌فنل بود($P<0/01$) (شکل ۷). کبد مهمترین عملکردها را برای متابولیسم، دفع، تغییر و دگرگونی زیستی مواد آلاینده و همچنین بزرگترین محل برای ذخیره و تجمع این مواد را دارا می‌باشد (Cengiz and Unlu, 2006) بیشترین استروژن در ماهی ماده ۱۷ -بتا استرادیول است که ابتدا در تخمدان توسط سلول‌های فولیکولی تولید می شود و به علت اهمیت این هورمون در ایجاد علائم رفتاری تولید مثلی، نمو و نگهداری‌علائم ثانویه جنسی، استروژن و آندروژن در تولید گامت‌ها نقش دارند. در ماهیان تولید استرادیول در تخمدان منجر به سنتز مقدار بسیاز زیادی پروتئین ویتلوژنین توسط هپاتوسیت‌ها (سلول‌های کبدی)می‌شود. این لیپو پروتئین سنگین، پیش ماده پروتئین زرده، از سلول های کبدی توسط سیستم جریان خون به تخمک‌ها انتقال پیدا کرده و در توسعه تخمک و رسیدگی آن دخالت می کند. بنابراین نونیل فنل‌نیز به دلیل شباهت ساختاری زیادی که با استرادیول دارد، می‌تواند چنین نقشی را ایفا کند و بدلیل ویژگی تجمع دهندگی بالای سلول های کبدی میزان ۴- نونیل فنل در کبد کپور ماهی بالاتر از عضله آن اندازه گیری شده است (Hiramatsu *et al.*, 2005). بر همین اساس مطالعات Lye و همکاران (۱۹۹۹)، در بررسی میزان ۴-نونیل فنل و بیس فنل آدر عضله وکبد ماهیان مصب‌های Tees و Tyne انگلستان، Bjerregaard و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعات آزمایشگاهی در بررسی میزان بیس فنل آ درکبد و عضله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و نیز Shao و همکاران (۲۰۰۵)، در مقایسه میزان ترکیبات فنلی در آبشش و کبد نسبت به عضله دو گونه ماهی *Coreius* (*hetetodon*) و (*Rhirogobio ventralis*)، بالا بودن میزان این ترکیبات را در کبد نسبت به عضله گزارش و تأیید نموده‌اند. علاوه بر این عوامل شبه استروژنی نقش استروژن را بازی کرده، به گیرنده‌های کبدی متصل شده و باعث تحریک ترشح ویتلوژنین می‌شوند. لذا می‌توانند در فعالیت این غده و تغییرات وزن آن در زمان تحریکات ترشحی مثل ترشح ویتلوژنین نقش داشته باشند. در تحقیق حاضر تغییرات و معنی‌دار بودن شاخص کبدی در تیمارهای نونیل فنل با غلظت ۵۰ میکرو گرم برگرم وزن بدن ماهی، در ماهی نر و ماده، بر نقش کبد در دفع سموم و عوامل آلوده‌کننده حکایت دارد، زیرا کبد نقش مهمی دردفع سموم در مهره‌داران دارد. همچنین باید اشاره نمود که شاخص‌کبدی به طور طبیعی در زمان ویتلوژنز افزایش‌می‌یابد. Cody و Barton (۱۹۹۹) نشان دادند که شاخص کبدی در زمانی که ماهی در معرض ماده استروژن‌زا بوده و تغذیه نداشته است؛ کاهش می‌یابد؛ اما وزن کبد ممکن است به‌علت تغییرات پاتولوژیک افزایش یابد. در مطالعه حاضر، شاخص کبدی بعد از در معرض قراردادن با نونیل فنل درد و جنس نر و ماده، در تیمار های ۵۰ میکرو گرم بر گرم نونیل فنل بر وزن بدن ماهی، افزایش یافته است که به نظر می‌رسد به خاطر افزایش تحریکات تولید ویتلوژنین در کبد باشد که منجر به افزایش‌وزن کبد شده است و به علت افزایش تحریکات تولید ویتلوژنین‌ضریب هپاتوسوماتیک، افزایش یافته است. Martin- Skilton و همکاران (۲۰۰۶) اثرنونیل فنل با غلظت ۳۰ میکروگرم در لیتر را بر روی ماهی turbot (*Scophthalmus maximus*) نابالغ و روغن ماهی نابالغ (*Gadus morhua*) مورد بررسی قرار داد ند. با قرار گرفتن در معرض نونیل فنل میزان فاکتور وضعیت (CF)

www.SID.ir

Arshive of SID

و شـــاخص کبـدی (HSI) در مـاهی turbot بـه‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار کنترل مشاهده شد. در مقابل، میزان CF و HSI در روغن ماهی تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل نداشـــت. در این آزمایش به خاطر بالاتر بودن فعالیت آنزیم خنثی‌کننده زنوبیوتیک (GST) در روغن ماهی نسـبت به ماهی turbot، میزان حسـاسـیت روغن ماهی در مقابل نونیل فنل کمتر از ماهی turbot بود. در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۰۹) مقدار شـاخص HSI در اثر مواجهه با ۱۷-بتااسترادیول (E_2) به مدت ۲۱ روز به اندازه ۲ برابر افزایش‌یافت که علت آن، افزایش تولیدویتلوژنین‌در پاسخ به استرادیول مطرح شد. افزایش شـــاخص HSI در پاســخ به ترکیبات اســتروژنی در مطالعات دیگر نیز گزارش شـــد (Verslycke *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2005). در تـحـقـیـق دیـگـری قرارگرفتن ماهی نابالغ قزل‌آلای رنگین کمان به مدت ۴ روز در معرض نونیل فنل با غلظت ۱۸ میکروگرم در لیتر، افزایش شـــاخص کبدی (HSI)، افزایش بیان ژن ویتلوژنین و کاهش‌لنفوسیت‌های‌خون را به دنبال داشت. همچنین قرارگرفتن در معرض نونیل فنل باعث افزایش تلفات در تســت مقاومت به بیماری شـــده اســت (Shelley *et al.*, 2009). نونیل فنل در کبد جنس نر نیز که در حالت طبیعی ویتلوژنین تولید نمی‌کند، باعث تولید ویتلوژنین می‌شود. زیرا سلول‌های کبدی در جنس نر نیز دارای گیرنده‌های استروژنی می‌باشند و نونیل فنل با اتصـــال به این گیرنده‌ها منجر به تولید ویتلوژنین در کبد می‌شـود. همچنین افزایش وزن کبد ممکن اسـت ناشـــی از تغییرات پـاتولوژیکی (هـایپرتروفی و هایپرپلازی) ایجاد شـــده در کبد بر اثر مواجهه با آلاینـــده‌هـا بـاشـــد (Schlenk *et al.*, 2008). Christiansen و همکـاران (۱۹۹۸) اثر مـاده شـــبـه استروژنی ۴- نونیل‌فنل را بر سنتزویتلوژنین در جنس نر ماهی کفشـک (*platichthys flesus*) مورد سـنجش قرار دادند. در این تحقیق ماهیان در مدت ۲ هفته به صـــورت تزریق درون صـــفاقی (iP) دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در گرم وزن بدن از ماده ۴- نونیل فنل دریافت کردند. تزریق داخلی صـــفاقی نونیل فنل در طول دورهٔ اسپرماتوژنز در ماهی کفشـک باعث افزایش ویتلوژنین پلاســما به صـــورت وابسـته به غلظت شـد. علاوه بر آن افزایش میزان ویتلوژنین سـبب افزایش معنی‌دار در شـاخص هپاتوسـوماتیک (HSI) و میزان RNA کل در کبد شد. نتایج این بررسی نشان داد که درصـد تلفات در دوزهای بالای ۴- نونیل فنل (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در گرم وزن بـدن) بـه میزان قـابـل توجهی‌افزایش‌یافت. همچنین تزریق داخل صفاقی نونیل فنل در طول دوره اسـپر ماتوژنز در ماهی نر eelpout (*Zoarces viviparous*) بـاعـث کـاهش معنی‌دار در شـــاخص گنادوســـوماتیک (GSI) و افزایش ویتلوژنین پلاسما به صورت dose-dependent شد. ضمن اینکه مطالعات بافت شـــناســـی نشـــان داد که لوبول‌های seminiferous در ماهی‌های تزریق شده، دژنره شدند (Christiansen *et al.*, 1998). Zha و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی خود نشان دادند که مواجهه ماهی Rare minnow (*Gobio cypris rarus*) بالغ به مدت ۲۸ روز با غلظت های ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل باعث افزایش شاخص گناد و سوماتیک در جنس نر و نیز القاء ویتلوژنین در پلاسمای جنس نر شد. همچنین غلظت ۳۰ میکروگرم در لیتر باعث هایپرتروفی، تجمع مواد ائوزینوفیلی و ایجاد آسیب در ساختار سلولی‌کبد شـــد. درکلیه نیز غلظت ۳۰ میکروگرم در لیترنونیل‌فنل باعث تجمع مواد ائوزینوفیلی و همچنین ایجاد هموراژی

www.SID.ir

Arshive of SID

در توبول های کلیوی و هایپرتروفی اپی‌تلیوم توبول ها شـــد. در این آزمایش پیشـــنهاد شـــد که علت بروز آسـیب‌های کبدی و کلیوی مشـاهده شـده می‌تواند به خاطر تولید و تجمع ویتلوژنین باشـــد (Zha *et al.*, 2007). در مطالعه حاضر مقدار شاخص GSI در جنس ماده در تمامی تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل داشـــت، امـا در غلظـت متوســط (۵۰ میکروگرم برگرم وزن بدن) مقدار این شـاخص افزایش جزئی نسـبت به گروه کنترل داشـت که می‌تواند به دلیل تجمع ویتلوژنین در تخمدان باشـــد.این مطالعه نشـــان دادکـه ۴- نونیـل فنـل می توانـد بـاعـث اختلالات ایمونولوژیکی در ماهیان شـــودکه موجب تضـــعیف و سرکوب سیستم ایمنی و در نهایت منجر به مرگ ماهیان شود.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی و نیز کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی و تمامی کســـانی که در انجام مراحل مختلف این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Arukwe, A., Forlin, L., Goksoyr, A., 1997. Xenobiotic and steroid biotrans formation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 2576-2583.
2. Bjerregaard, P., Hansen, P.R., Larsen, K.J., Erratico, C., Korsgaard, B., Holbech, H., 2007. Vitellogenin as a biomarker for estrogenic effects in brown trout, (*Salmo trutta*). Laboratory and field investigations Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 2387-2396.
3. Bjorkblom, C., 2009. Assessment of endocrine disruptingactivities in the aquatic environment. Academic dissertation. Bo Akademi University. 12 p.
4. Bartone, S., Cody, R., 1999. Morphological masculinization in poeciliid females from apaper mill effluent receiving tributary of the St.JohnsRiver, Florida, USA. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63, 150-156.
5. Berczi, I., Nagy, E., 1998. Hormones as immune modulating hormones. In: Thomas E, Kresina F, Editors. Immune modulating agents. New York: Marcel Dekker Inc., 75-120.
6. Casini, S., Fossi, M.C., Mori, G., Bjornstad, A., 2000. Vitellogenin induction in Cyprinus carpio treated with 17 β-estradiol and 4-nonylphenol. Environmental Monitoring and Assessment, 75, 235–239.
7. Chen, X., Yao, G., Hou, Y., 2005. Pentachlorophenol reduces B lymphocyte function throughproin flamma- tory cytokines in Carassius auratus. Food and Chemical Toxicology, 43(2), 239-245.
8. Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, A., 1998. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17β-estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout (Zoarces viviparous). Marine Environmental Research, 46, 141-144.
9. Cengiz, E.I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure ofthe gill, liver and gut tissues of mosquitofish, (*Gambusiaaffinis*) Amicroscopicstudy. Environmental Toxicology and Pharmacology. 21, 246-253.
10. Colburn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P., 1997. Our stolen future. Plume Penguin Books. New York, NY, 316 p.
11. Cook, J., 1994. The effects of stressbackground colour and steroid hormones on the lymphocytesof rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* Ph.D.Thesis, University of Sheffield. 129 P.
12. Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Siwicki, A.K., 1990. In vivo effect of the organophosphorus insecticidetrichlorphon on the immune response of carp (*Cyprinus carpio).* I. Effect of contamination onantibody production in relation to residue level in organs. Ecotoxicology and Environmental Safety, 19(1), 93- 98.
13. Cuesta, A., Vargas-Chacoff, L., Garcia-Lopez, A., Arjona, F.J., Martınez-Rodrıguez, G., Meseguer, J., Mancera, J.M., Esteban, M.A., 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune

www.SID.ir

Arshive of SID

immunomodulation. Aquatic Toxicology, 72(4), 305-314.
27. Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., Mc Cormick, S.D., Vanveld, P.A., Ottinger, C.A., 2009. Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, Ameiurus nebulosus. Aquatic Toxicology, 93, 70–82.
28. Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mathiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition testicular growth in rainbow trout Oncorhynchus mykiss exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, Environmental Toxicology, 15, 194–202.
29. Karrow, N.A., Bols, N.C., Whyte, J.J., Solomon, K.R., Dixon, D.G., Boermans, H.J., 2001. Effects of creosote exposure on rainbow trout pronephros phagocyte activity and the percentage of lymphoid B cells. Journal of Toxicology and Environmental Health .Part A: Current Issues, 63(5), 363-381.
30. Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A., Zelikoff, J., 1997. Aquatic Ppollution-induced immunotoxicity in wildlife species. Fundamentaland Applied Toxicology, 37(1), 1-15.
31. Maule, A.G., Jorgensen, E.H., Vijayan, M.M., Killie, J.E.A., 2005. Aroclor 1254 exposure reduces disease resistance and innate immune responses in fasted arctic charr., Environmental Toxicology, 24, 117–124.
32. Martin-Skilton, R., Thibaut, R., Porte, C., 2006. Endocrine alteration in juvenile cod and turbot exposed to dispersed crude oil and alkylphenols. Aquatic Toxicology, 78, 57-64.
33. Moens, L.N., Van der ven, K., Remortel, P.V., DelFavero, J., DeCoen, W.M., 2006. Expression profiling of endocrine - disrupting coumpounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. Toxicology Sciences, 93, 298–310.
34. Mortazavi, S., Riyahi-Bakhtiari, A., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrinedisrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octhylphenoland bisphenol A. Marine Pollution Bulletin, 64, 1067-1073.
35. Nakayama, A., Kurokawa, Y., Harino, H., Kawahara, E., Miyadai, T., Seikai, T., Kawai, S., 2008. Effects of tributyltin on the immune system of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus)*. Aquatic Toxicolology, 83, 126–133.
36. Nakayama, K., Kitamura, S., Murakami, Y., Song, J.Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Iwata, H., Tanabe, S.T., 2009.Toxicogenomic analysis of immune system -related genes in Japanese parameters of gilthead seabream. Fish and Shellfish Immunology, 23, 693–700.
14. Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. Molecular Immunology, 45(8), 2333-2342.
15. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. RobersonandW.B, van Muiswinkel. Techniques in Fish Immunology, 1, l-103.
16. Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2003. Cytokines and the immunetesticular axis. Journal of Reproductive, Immunology, 58(1), 1-26.
17. Hiramatsu, N., Cheek, A.O., Sullivan, C.V., Matsubara T., Hara, A., 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: T.P. Mommsen & T.W. Moon, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 6, 431-471.
18. Hoeger, B., van den Heuvel, M.R., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Effects of treated sewage effluenton immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 70(4), 345-355,
19. Hou Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Changes in immunoglobulin producing cells in response to gonadal maturation in rainbow trout. Fisheries Science, 5, 44-965.
20. Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Effects of steroids on the antibody producing activity of lymphocytes in rainbow trout. Fisheries Science, 2, 580.
21. Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Effects of steroids on immunoglobulin (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Bio- chemistry, 20, 155-162.
22. Hou, Y., Han, X.D., 2001. Effects of estradiol-17beta on immunocom- petence in rainbow trout. Acta Zoologica Sinica, 47, 285-291.
23. Htun-han, M., 1977. The effects of photoperiod on reproduction in fishes: an annotated bibliography. Fish Food G B., 6, 30.
24. Imai, S., Koyama, J., Fujii, K., 2005. Effects of 17b-estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. Marine Pollution Bulletin, 51, 708–714.
25. Iwanowicz, L.R., Ottinger, C.A., 2001. Estrogens, Estrogen Receptors and Their Role as Immuno-regulators in Fish. In book: Fish Defenses Vol. 1: Immunology, Chapter: 9, Publisher: Science Publishers, pp.277-322.
26. Iwanowicz, L.R.., Lerner, D.T., Blazer, V.S., McCormick, S.D., 2005. Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: indicationso fshort-and long-term

www.SID.ir

Arshive of SID

flounder *(Paralichthys olivaceus)* exposed to heavy oil. Marine Pollution Bulletin, 57(6-12), 445-452.
37. Rice, C.D., Xiang, Y., 2000. Immunefunction, hepatic CYP1A, and reproductive biomarker responsesin the gulf killifishFundulus grandis, during dietary exposures to endocrin disrupters. Marine Environmental Research, 50, 163–168.
38. Saha, N.R., Usami, T., Suzuki, Y., 2004. In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp *(Cyprinuscarpio*). Fish and Shellfish Immunology, 17, 149–158.
39. Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysosyme: An important defense molecule of fish inateimmune system. Aquaculture Research, 39, 223-239.
40. Schlenk, D., Handy R., Steinert S., Depledge M.H., Benson W., 2008. Biomarkers. In: R.T.Di Giulio & D.E. Hinton, TheToxicology of fishes, 3, 683-731.
41. Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R.D., 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethiny-lestradiol: haematological and histopathological effects in juve- Nile Common carp (*Cyprinus carpio*). Aquatic Toxicology, 51, 69–78.
42. Shao, B., Hu. J., Yang, M., An, W., Tao, S., 2005. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48, 467–73.
43. Shelley, L.K., Balfry, S.K., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2009. Immunotoxicological effects of sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 92(2), 95-103.
44. Siwicki, A.K., Cossarini-Dunier, M., Studnicka, M., Demael, A., 1990. In vivo effect of the organophosph-osphorusinsecticidetrichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. Ecotoxicology and Environmental Safety, 19(1), 99-105.
45. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41, 125-139.
46. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environmental International, 34, 1033-1049.
47. Suzuki, Y., Orito, M., Iigo, M., Kezuka, H., Kobayashi, M., Aida, K., 1997. Seasonal changes in blood IgM levels in goldfish, with special reference to water temperature and gonadalmaturation. Fisheries science, 62, 754–759.
48. Taysse, L., Troutaud, D., Khan, N.A., Deschaux, P., 1995. Structure activity relationship of phenolic compounds (phenole, pyrocatechol andhydroquinone) on natural lyphocytotoxicity of carp (*Cyprinuscarpio*), Toxicology, 98, 207-214.
49. Tahir, A., Secombes, C.J., 1995. The effects of diesel oil-based drilling mud extracts on immune responses of rainbow trout. Archives of Environmental Contaminationand Toxicology, 29(1), 27–32.
50. Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. Veterinary Clinical Pathology, 36, 49-54.
51. Thilagam, H., Gopalakrishnan, S.B.O.J., Wang, K.J., 2009. Effect of 17beta-estradiol on the Immunocompetence ofJ apanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 1722– 1731.
52. Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. Critical Reviews in Toxicology, 28 319–61.
53. Verslycke, T., Vandenbergh, G.F., Versonnen, B., Arijs, K., Janssen, C.R., 2002. Induction of vitellogenesis in 17a-ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a methodcomparison. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 132, 483-492.
54. Wang, R., Belosevic, M., 1999. Estradiol in-creases susceptibility of goldfish to trypanosome anilewskyi. Developmental and Comparative Im- munology, 18, 377-387.
55. Watanuki, H., Yamaguchi, T., Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11 ketotestosterone. Comparative Biochemistry and Physiology, 132, 407-413.
56. Witeska, M., Knodera, E., Lugowski, K., 2010. The effects of Ichthyophthiriasis on some hematological parameters in common carp. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 34, 267-271.
57. Yamaguchi, T., Watanuki, H., Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and

www.SID.ir

Arshive of SID

testosterone on the function of carp, Cyprinus carpio, phagocytes in vitro. Comparative Biochemistry and Physiology, 129, 49-55.

58. Yin, D.Q., Hu, S.Q., Gu, Y., Wei, L., Liu, S.S., Zhang, A.Q., 2007. Immunotoxicity of bisphenol A to carassius auratus lympho- cytes and macrophages following in vitro exposure. Journal of Environmental Sciences, 19, 232–237.
59. You, H.J., Choi, C.Y., Jeon, Y.J., Chung, Y.C., Kang, S.K., Hahm, K.S., Jeong, H.G., 2002. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by 4-nonylphenol in macrophages. Biochemical and Biophysical. Research Communication, 294, 753-759.
60. Zha, J., Wang, Z., Wang, N., Ingersollc, C., 007. Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. Chemosphere, 66(3), 488-495.
61. Zar, J.H., 1999. Blostatistical Analysis. Prentic Hall. (4th Edition) New Jersey, 663 p.

www.SID.ir