اثر استروژنیک ۴-نونیل فنل بر سنتز ویتلوژنین در جنس نر نابالغ ماهی شانک زردباله، *Acanthopagrus latus* (Teleostei: Sparidae) (Houttuyn, 1782)

محمد نادری[۱]، علیرضا صفاهیه[۱،*]، سیمین دهقان مدیسه[۲]، حسین ذوالقرنین[۲]، ابراهیم رجب زاده قطرمی[۳] و سیمین عیدی وند[۴]

[۱] خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا

[۲] خرمشهر، مرکز تحقیقات شیلات جنوب، گروه بیولوژی دریا

[۳] خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۴] بندر امام خمینی(ره)، مرکز پژوهش پتروشیمی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

در مطالعه حاضر اثر ماده استروژنیک ۴-نونیل فنل بر ساخت ویتلوژنین در جنس نر نابالغ ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان در خلال دو هفته و بصورت تزریق درون صفاقی، غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر گرم بر هفته از ۴-نونیل فنل را دریافت نمودند. به ماهیان یک گروه نیز ۲ میکروگرم بر گرم بر هفته از ۱۷بتا-استرادیول تزریق شد. گروه کنترل حلال، تنها محلول روغن نارگیل و اتانول را دریافت کردند در حالیکه بر روی ماهیان کنترل هیچگونه تزریقی صورت نگرفت. از ماهیان در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ نمونه برداری به عمل آمد. تحریک ساخت ویتلوژنین در پلاسمای ماهیان تیمار شده بصورت غیر مستقیم و با اندازه‌گیری فسفات باز ناپایدار (ALP) و کلسیم کل پلاسما مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر افزایش یافته این اندیکاتورها در پلاسما، نشان دهنده تحریک وابسته به دوز ساخت ویتلوژنین توسط کبد ماهی های شانک تیمار شده با ۴-نونیل فنل بود. همچنین القاء شدن ساخت ویتلوژنین با افزایش شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) ماهیان تیمار شده با ۴-نونیل فنل نیز قابل تأیید بود. یافته‌های این تحقیق حاکی از توانایی نونیل فنل در ایجاد اثر استروژنیک می‌باشد به گونه‌ای که توسط افزایش سنتز ویتلوژنین و HSI نشان داده شد.

واژه های کلیدی: ۴-نونیل فنل، ویتلوژنین، فسفات باز ناپایدار(ALP)، ۱۷بتا-استرادیول، شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۸۳۳۱۸۲۱ ، پست الکترونیکی: Safahieh@hotmail.com

مقدمه

برخی از ترکیبات شیمیایی زنوبیوتیک (Xenobiotic) قادرند از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم موجب تداخل در سیستم اندوکرینی انسان و سایر جانوران گردند، از اینرو در سالهای اخیر نگرانی درباره آنها افزایش یافته است (۲۸).

آلکیل فنل‌ها (Alkylphenols) ترکیباتی فنلی می‌باشند که از اتصال یک یا تعداد بیشتر زنجیره آلکیلی به یک حلقه آروماتیک تشکیل می‌شوند. این ترکیبات از واسطه هایی در پالایش نفت و قطران ذغال سنگ به وجود می آیند (۴۱). همچنین از اجزای طبیعی نفت خام بوده و از اینرو مقادیر زیادی از آنها بعد از جداسازی آب از نفت در محل

Archive of SID
www.SID.ir

سکوهای نفتی وارد فاز آبی می‌گردد (۳۹). نونیل فنل (Nonylphenol) (NP) یکی از اعضای خانواده آلکیل فنل ها بوده که بطور گسترده ای در ساخت فسفیت‌های نونیل فنل، اسپری‌های حشره‌کش آمینوکارب و نونیل فنل اتوکسیلات‌ها (Nonylphenol ethoxylates) به کار می رود (۲۵). نونیل فنل اتوکسیلات‌ها یک گروه بزرگ از سورفاکتانت‌های غیریونی می‌باشند که در تولید روغن موتورها، امولسیون کننده ها، پلاستیک‌ها، رنگ های لاتکس، دترجنت های خانگی و صنعتی، حلال ها و صنایع کاغذ و منسوجات به کار گرفته می‌شوند (۲۴,۳۷). فسفیت های نونیل فنل نیز بطور متداول بعنوان عوامل تثبیت کننده و آنتی اکسیدان در صنایع لاستیک و پلاستیک سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نونیل فنل همانند سایر آلکیل فنل‌ها در محیط مقاوم بوده، بسیار چربی دوست می‌باشد و متعاقبا میتواند منجر به تجمع زیستی در موجودات آبزی گردد (۱,۳۶). بعلاوه مشخص گردیده است که این ترکیب قادر به تحریک رشد سلول‌های سرطان پستان انسان در کشت سلولی می‌باشد (۳۸,۴۴). به دلیل شباهت ساختاری با ۱۷بتا–استرادیول (E2) ، نونیل فنل اثر این هورمون طبیعی را به وسیله رقابت برای اتصال به گیرنده های استروژن کبدی تقلید کرده و از اینرو قادر است عملکرد طبیعی سیستم اندوکرینی را تحت تاثیر قرار دهد (۳۷). علاوه براین نونیل فنل و نونیل فنل اتوکسیلات ها قادر به ایجاد تغییرات در ساختار بیضه‌ای و تحریک سنتز ویتلوژنین (Vitellogenin) در ماهیان، هم در شرایط محیطی و هم در شرایط آزمایشگاهی بوده اند (۲۰,۲۷).

ویتلوژنین یک گلیکولیپوفسفوپروتئین بزرگ سرم بوده که بصورت طبیعی توسط جنس ماده مهره داران تخم گذار و در پاسخ به استروژن‌های درونی در کبد تولید شده به درون خون آزاد گشته و در اووسیت‌های در حال رشد ذخیره می‌گردد (۱۵). در بررسی‌های متعددی از ویتلوژنین جهت تعیین حضور ترکیبات شیمیایی استروژنیک در اکوسیستم‌های آبی استفاده شده است. به عنوان مثال در رودخانه‌های انگلستان، ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) قرار گرفته در معرض خروجی-های فاضلاب که حاوی مقادیر زیادی از آلکیل فنل‌ها بودند، سطوح ویتلوژنینی ۵۰۰ تا ۱۰۰/۰۰۰ برابر بیشتر از ماهیان بالا دست این خروجی‌ها داشتند (۳۳). همچنین بررسی‌های پیشین نشان داده اند که تیمار با هر دو ترکیب ۱۷بتا–استرادیول و نونیل فنل می تواند منجر به تحریک سنتز این پروتئین در ماهیان آب شیرین گردد (۶,۲۲).

ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس به شمار می‌آید. این ماهی قادر به زندگی در آب‌های شیرین، لب شور و محیط‌های دریایی بوده و ارزش اقتصادی بالا، سازگاری آسان با اسارت و در دسترس بودن تکنولوژی پرورش آن (۱۶,۳۴) موجب شده که در سالهای اخیر پرورش این ماهی در آبهای جنوبی کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار گردد. یکی از زیستگاههای عمده شانک زردباله در آبهای جنوبی کشور، منطقه خورموسی است. از طرف دیگر استقرار صنایع پتروشیمی در اطراف خور و متعاقبا تخلیه حجم زیادی از پسابهای این تاسیسات به آبهای منطقه و همچنین ورود مقادیر بالایی از مواد نفتی، روغن موتور کشتی‌ها، فاضلاب‌های شهری و غیره موجب گشته که محیط خور موسی به سطوح بالایی از ترکیبات مختل کننده اندوکرینی (Endocrine disrupter chemicals) از جمله نونیل فنل آلوده باشد. از اینرو وجود این ترکیبات می تواند تهدیدی جدی برای آبزیان این منطقه و حتی انسان بشمار آید. بطوریکه سلامت تولید مثلی آبزیان به خطر افتاده و به مرور زمان منجر به کاهش جمعیت‌های آنها گردد که این عامل خود پیامدهای سوء دیگری را به همراه دارد. تاکنون بررسی های اندکی در ارتباط با تاثیرات مواد زنواستروژن (Xenoestrogen) در ماهیان دریایی انجام شده و از این حیث در کشور مطالعه‌ای صورت نگرفته است. ماهی شانک زردباله یک ماهی هرمافرودیت پروتاندروس است (۱۶). لذا اختلالات اندوکرینی می تواند تمایز جنسی و

www.SID.ir

متعاقبا سلامت تولید مثلی این گونه را به خطر بیاندازد. از طرف دیگر پروتاندروس بودن این ماهی می تواند یک مزیت (نر بودن در مراحل اولیه زندگی) برای استفاده از آن در مطالعه مختل کننده های اندوکرینی باشد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استروژنیک نونیل فنل بر سنتز ویتلوژنین در ماهی شانک زردباله بود. القاء شدن ویتلوژنین می تواند یک هشدار اولیه از اثرات مضر نونیل فنل در این ماهی بشمار آید.

مواد و روشها

تامین ماهی و دوره سازگاری (Acclimation): تعداد ۱۰۴ قطعه ماهی شانک زرد باله نر نابالغ (میانگین وزنی ۲/۴±۱۳۳/۷ گرم) از خور زنگی و جعفری (از انشعابات خور موسی، ایران) صید شدند (شکل ۱). ماهی‌ها پس از انتقال به سوله مرکز تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) بصورت تصادفی در ۸ تانک ۳۰۰ لیتری (۱۳ ماهی در هر تانک) با آب فیلتر شده دریا که توسط اشعه UV تیمار شده بود (شوری ‰۴۵، pH ۸/۱±۰/۲، دمای ۲۶ درجه سانتی گراد) و تحت سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی قرار داده شدند. تعویض آب روزانه ۸۰ درصد و جهت سازگاری ماهی ها با شرایط جدید۱۰ روز در نظر گرفته شد. در کل دوره آزمایش هیچ گونه غذا دهی صورت نگرفت.

تزریق ماهیان: بمنظور مواجهه ماهی شانک زرد باله با ۴-نونیل فنل در این تحقیق، از روش تزریق استفاده شد. بدین منظور پس از بیهوش کردن با ۲-فنوکسی اتانول ۰/۱٪ (Merck, Germany)، ماهیان ۵ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر گرم از ۴-نونیل فنل (TCIEurope, Belgium) در خلال ۲ هفته و بصورت درون صفاقی تحت تزریق قرار گرفتند. همچنین ماهیان ۱تیمار دوز ۲ میکروگرم برگرم از ۱۷بتا-استرادیول (Sigma, USA) را دریافت کردند. علت استفاده از ۱۷بتا-استرادیول در این مطالعه آزمودن فرضیه اثر استروژنیک نونیل فنل بود (۲۰). تزریق ها به میزان نصف دوز و دوبار در هفته انجام پذیرفت. گروه کنترل حلال (Solvent control) تنها میزان ۰/۱ میلی لیتر از حلال (روغن نارگیل + اتانول) را دریافت کردند در حالیکه بر روی ماهیان کنترل هیچگونه تزریقی صورت نگرفت.

نمونه برداری : در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ از ماهیان نمونه برداری به عمل آمد. جهت نمونه برداری، پس از بیهوش نمودن و ثبت طول کل و وزن، از ساقه دمی ماهیان به وسیله سرنگ ۲ میلی لیتری تیمار شده با هپارین خونگیری شد. سپس نمونه های خون به مدت ۱۰ دقیقه در دور g×۱۰۰۰ سانتریفوژ گشته و پلاسما به لوله های اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه های پلاسما تا زمان آنالیز در دمای۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از خونگیری کبد ماهیان به سرعت خارج گشته و به وسیله ترازو ۰/۰۰۱ گرم (FX-300AND, Japan) وزن شدند. شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) (Hepatosomatic index) از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

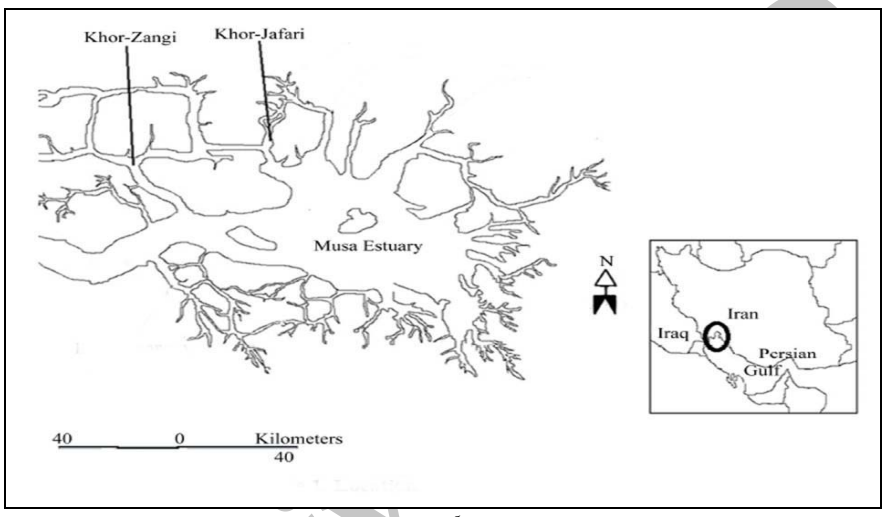
$$HSI\ (\%) = \text{وزن کبد} / \text{وزن بدن} \times ۱۰۰$$

سنجش ویتلوژنین :جهت سنجش ویتلوژنین از روش غیر مستقیم فسفات باز ناپایدار (ALP) (Alkali labile phosphate) استفاده شد. بطور مختصر پس از رسوب پروتئین های پلاسما به وسیله استن و۲ شستشوی پی در پی به وسیله تریس و اتانول، جهت آزاد سازی فسفات های باند شده به ویتلوژنین، پلت پروتئین در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تحت تیمار قلیایی به وسیله NaOH ۱ مولار قرار داده شد. در نهایت به وسیله ایجاد کمپلکس آمونیوم فسفومولیبدات و احیاء آن توسط اسکوربیک اسید، رنگ آبی حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO UV-2100, USA) قرائت شد (۱۴).

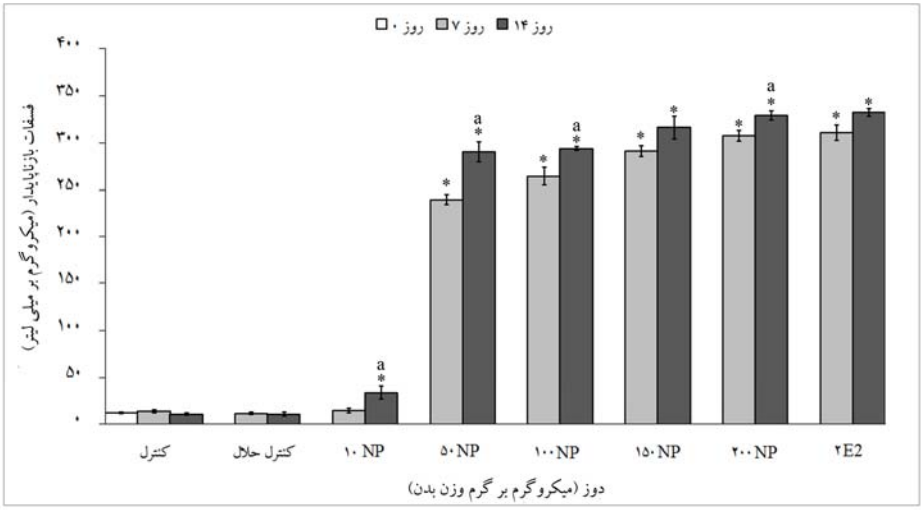
www.SID.ir

کلسیم کل پلاسما نیز با استفاده از کیت آزمایشگاهی زیست شیمی، به روش ارتوکرزول فتالئین و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS 16 استفاده شد. تمامی مقادیر بصورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است. نرمال بودن داده ها توسط تست Shapiro-wilk بررسی شد. از آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) بمنظور تعیین معنی‌داری اثر تیمارهای مختلف، زمان و برهمکنش آنها استفاده گردید. سپس با استفاده از پس آزمون دانکن معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مشخص شد. آنالیز رگرسیون خطی ساده جهت تعیین معنی‌داری ارتباط میان مقادیر ALP با سطوح کلسیم و همچنین ارتباط HSI با دوزهای مختلف ۴- نونیل فنل در طول دوره آزمایش انجام پذیرفت. سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها $P<0.05$ در نظر گرفته شد.



شکل ۱- مکان های جمع آوری نمونه ها در خور موسی.



شکل ۲- غلظت فسفات باز ناپایدار (ویتلوژنین) در پلاسمای جنس نر نابالغ ماهی شانک زرد باله پس از مواجهه با دوزهای مختلف ۴-نونیل فنل و ۱۷بتا-استرادیول. علامت (*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل در ($P<0.05$). حرف (a) بیانگر اختلاف معنی دار در دوز یکسان نسبت به روز ۷ می‌باشد ($P<0.05$). NP، ۴-نونیل فنل؛ E2، ۱۷بتا-استرادیول.

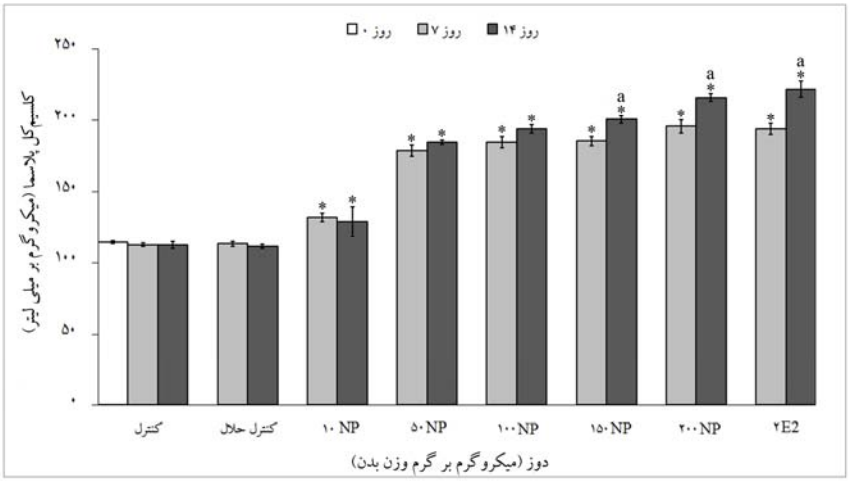
www.SID.ir

نتایج

در طول دوره آزمایش تعداد ۶ ماهی تلف شدند. تمامی مرگ و میرها در هفته آخر آزمایش و مربوط به دوزهای ۱۰۰ (n=۱)، ۱۵۰ (n=۲) و ۲۰۰ میکروگرم برگرم (n=۲) از ۴-نونیل فنل و ۲ میکروگرم برگرم (n=۱) از ۱۷بتا-استرادیول بود. همچنین پس از کالبدشکافی جنسیت ۲ ماهی، مربوط به یک تیمار از ۴-نونیل فنل (۵۰ میکروگرم برگرم) و یک تیمار از ۱۷بتا-استرادیول (روز ۱۴)، ماده تشخیص داده شد که نمونه های پلاسما و کبد آنها از جریان آزمایش خارج گشت.

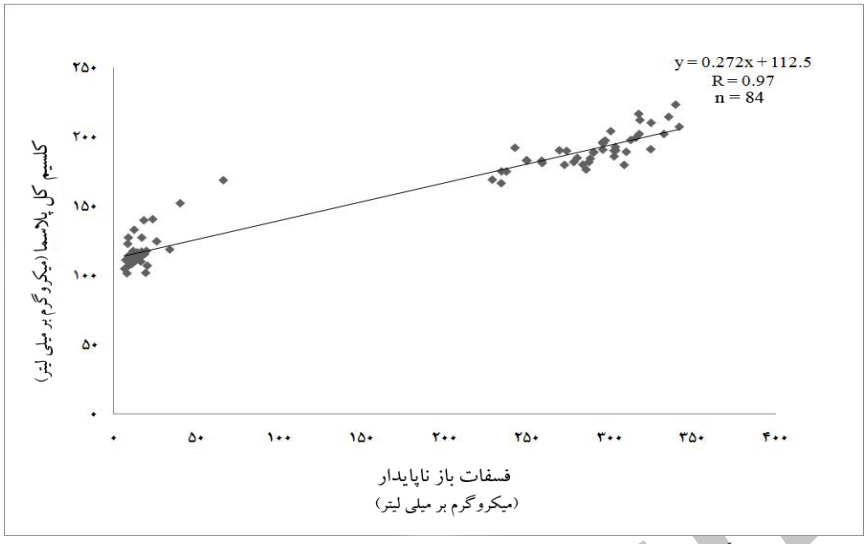
اثر استروژنیک ۴-نونیل فنل به وسیله تحریک سنتز پیش ماده پروتئین های زرده، ویتلوژنین، که بطور طبیعی در جنس نر و نابالغ ماهی شانک زرد باله وجود ندارد مشخص شد. مطابق شکل۲، سطوح ALP پلاسما در یک رفتار وابسته به دوز یک هفته پس از تزریق شروع به افزایش کرد ($P<0.05$). این وابستگی به دوز در پایان هفته دوم مشهودتر بود ($P<0.05$) با این وجود تفاوت معنی-داری بین سطوح ALP پلاسما در روزهای ۷ و ۱۴وجود نداشت. افزایش مشابهی نیز در سطوح ALP ماهیان تیمار شده با ۲ میکروگرم بر گرم از ۱۷بتا-استرادیول همانند دوزهای بالای ۴-نونیل فنل مشاهده شد ($P<0.05$، شکل ۲). همچنین سطوح کلسیم کل پلاسما در تمامی گروه های تیمار شده با ۴-نونیل فنل و ۱۷بتا-استرادیول بالاتر از گروه های کنترل و کنترل حلال بود ($P<0.05$، شکل ۳). افزایش مشابهی در سطوح کلسیم کل پلاسما در ماهیان تیمار شده با ۲ میکروگرم بر گرم از ۱۷بتا-استرادیول نیز وجود داشت. با این حال تفاوت معنی‌داری بین سطوح کلسیم کل پلاسما در روزهای ۷ و ۱۴ مشاهده نشد ($P<0.05$). علاوه بر این ALP و غلظت های کلسیم پلاسما یک همبستگی مثبت و معنی‌دار (R =۰/۹۷) را در کل دوره آزمایش نشان دادند ($P<0.05$، شکل ۴).

بطور کلی HSI در ماهیان تیمار شده بطور معنی‌داری (R = ۰/۹۹) با افزایش دوز ۴-نونیل فنل افزایش یافت ($P<0.05$، شکل ۵). میزان وزن تر کبد در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ اختلاف معنی‌داری را نشان می داد که بیشترین میزان HSI ثبت شده مربوط به روز ۱۴ بود ($P<0.05$، جدول ۱).

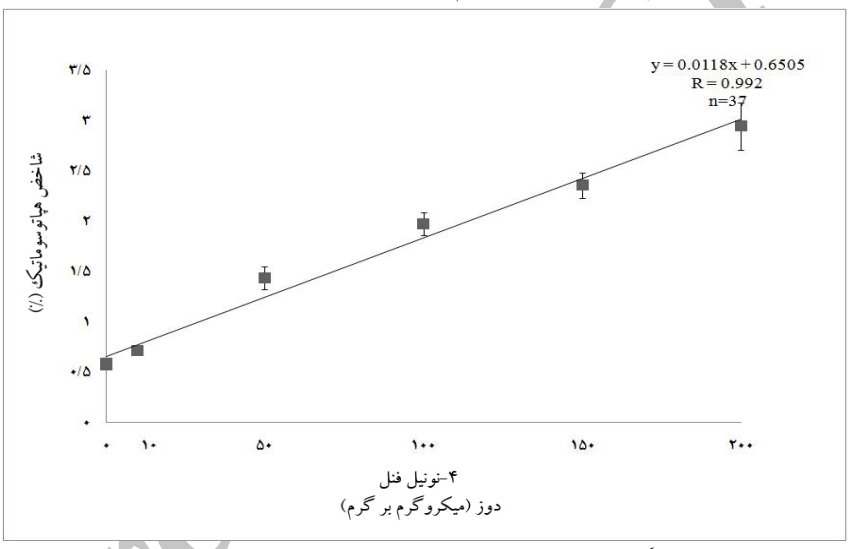


شکل۳- غلظت کلسیم کل پلاسمای ماهی شانک زرد باله نر نابالغ پس از مواجهه با دوزهای مختلف ۴-نونیل فنل و ۱۷بتا-استرادیول. علامت (*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل در ($P<0.05$). حرف (a) بیانگر اختلاف معنی دار در دوز یکسان نسبت به روز ۷ می‌باشد ($P<0.05$). NP، ۴-نونیل فنل؛ E2، ۱۷بتا-استرادیول.

www.SID.ir



شکل ۴- همبستگی میان غلظت های ALP و کلسیم کل پلاسما در ماهیان تمیار شده با ۴-نونیل فنل ($P<0.05$).



شکل ۵- همبستگی میان دوزهای مختلف ۴-نونیل فنل و شاخص هپاتوسوماتیک ($P<0.05$).

جدول ۱- میانگین شاخص هپاتوسوماتیک (HSI ± S.D) ماهی شانک زرد باله پس از ۷ و ۱۴ روز مواجهه با ۴-نونیل فنل و ۱۷بتا-استرادیول.

تیمار	روز ۰	روز۷	روز۱۴
کنترل	۰/۵۸ ± ۰/۰۲	۰/۵۷ ± ۰/۰۲	۰/۵۸ ± ۰/۰۳
کنترل حلال		۰/۵۸ ± ۰/۰۲	۰/۵۷ ± ۰/۰۲
۱۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل		۰/۷۴ ± ۰/۰۳	۰/۷۱ ± ۰/۰۴
۵۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل		۱/۳۳ ± ۰/۰۶ [a]	۱/۴۳ ± ۰/۱۱ [a]
۱۰۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل		۱/۳۲ ± ۰/۰۴ [a]	۱/۹۷ ± ۰/۱۱ [a,b]
۱۵۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل		۱/۴۱ ± ۰/۰۹ [a]	۲/۳۴ ± ۰/۱۲ [a,b]
۲۰۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل		۱/۶۸ ± ۰/۱۳ [a]	۲/۹۴ ± ۰/۲۳ [a,b]
۲ میکروگرم بر گرم ۱۷بتا-استرادیول		۲/۳۸ ± ۰/۰۸ [a]	۳/۳۶ ± ۰/۲۵ [a,b]

علامت ([a]) نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل است ($P<0.05$).

علامت ([b]) نشان دهنده تفاوت معنی دار HSI نسبت به روز ۷ در غلظت یکسان است ($P<0.05$).

www.SID.ir

بحث

ویتلوژنین یک نشانگر زیستی مناسب جهت ارزیابی قرار گرفتن جانوران تخم گذار در معرض استروژن ها یا ترکیبات شبه استروژنی است. نرها و نابالغ ها بصورت طبیعی قادر به سنتز ویتلوژنین نمی باشند اما به دلیل وجود ژن ویتلوژنین در کبد، مواجهه با ترکیبات استروژنیک منجر به تحریک ساخت این پروتئین در آنها خواهد شد (۹).

در مطالعه حاضر اثر استروژنیک یک ماده آلکیل فنلی، ۴-نونیل فنل، بر روی ساخت ویتلوژنین در جنس نر نابالغ ماهی شانک زرد باله مورد بررسی قرار گرفت. پیش از این در بررسی‌های متعددی نشان داده شده بود که ALP یک شاخص بسیار مطمئن از حضور ویتلوژنین در پلاسمای ماهیان می باشد (۴,۲۳). در حقیقت ویتلوژنین به عنوان تنها پروتئین حاوی فسفات در خون مهره داران تخم گذار در نظر گرفته می‌شود (۷) و این عامل همراه با درجه بالای فسفری شدن، سنجش غیر مستقیم ویتلوژنین را از طریق ALP امکان پذیر می سازد (۱۴). Kramer و همکاران (۱۹۹۸) در یک بررسی افزایش معنی‌دار سطوح ALP پلاسمای ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) را همراستا با افزایش غلظت ۱۷بتا-استرادیول نشان دادند (۴۰). در بررسی حاضر نیز سطوح ALP بطور معنی‌داری در تمامی گروه های تیمار شده با ۴-نونیل فنل (به استثنای دوز ۱۰ میکروگرم بر گرم در هفته اول) افزایش یافت (شکل ۲). سطوح ALP فلاندرهای نر (*P. flesus*) نیز که طی ۱۴ روز در معرض دوزهای مختلف از ۴-نونیل فنل قرار گرفته بودند بطور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (۷). همچنین Christiancen و همکاران (۱۹۹۸) در طی ۲۵ روز با بررسی تاثیر ۴-نونیل فنل در دوزهای پایین و بالا (۱۰ و۱۰۰ میکروگرم بر گرم) بر روی *Zoarces viviparous* نشان دادند که نونیل فنل با تقلید اثر ۱۷بتا-استرادیول همانند یک استروژن عمل کرده و موجب سنتز ویتلوژنین می‌گردد (۸). با این وجود سنتز ویتلوژنین در دوزهای پایین قابل توجه نبود. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که دوز ۱۰ میکروگرم بر گرم نسبت به سایر تیمارهای ۴-نونیل فنل، توانایی کمتری در تحریک سنتز ویتلوژنین دارد. این موضوع اشاره دارد که نونیل فنل در یک رفتار وابسته به دوز موجب تحریک سنتز ویتلوژنین می شود بطوریکه در چندین مورد برای قزل آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) گزارش شده بود (۱۸,۱۹). در یک مطالعه نونیل فنل موجب افزایش تراکم گیرنده استروژنی و mRNA ویتلوژنین در کشت سلولی هپاتوسیت های قزل آلای رنگین کمان شد (۱۰). از اینرو پیشنهاد گردید که این ترکیب از طریق اتصال به گیرنده استروژنی در یک مسیر رقابتی اما با توانایی بسیار کمتر (۱۰۰۰ مرتبه) از ۱۷بتا-استرادیول منجر به ایجاد اثر استروژنیک می گردد (۱۰). مطالعات دیگر نیز بطور مشابهی اظهار داشته اند که نونیل فنل مستقیماً و از طریق اتصال به گیرنده استروژنی موجب سنتز ویتلوژنین در کشت سلول‌های کبدی ماهیان می شود (۳۱,۳۵). با این حال مکانیسم دقیق اثر اندوکرینی این زنواستروژن در موجودات زنده هنوز ناشناخته باقی مانده است. تحقیقات اخیر اشاره دارد که نونیل فنل از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم منجر به اثرات استروژنیک می-گردد. به گونه‌ای که در ماهی قنات سرچرب (*P. promelas*) تمیار نونیل فنل به جای اثر مستقیم، به وسیله افزایش سطوح ۱۷بتا-استرادیول پلاسما منجر به افزایش تولید ویتلوژنین شد (۱۲).

ویتلوژنین یک لیپوفسفوپروتئین غنی از کلسیم می‌باشد، از اینرو در زمان سنتز آن مقادیر زیادی از کلسیم به درون پروتئین انتقال می یابد (۱۳). این کلسیم های باند شده به ویتلوژنین در جهت افزایش حلالیت این پروتئین بزرگ در خون می باشند (۱۱). پیش از این در چندین بررسی افزایش همزمان کلسیم و غلظت ویتلوژنین پلاسما به دنبال تحریک استروژنی نشان داده شده بود (۳,۵). نتایج بررسی حاضر نیز نشان دهنده سطوح بالاتر کلسیم کل پلاسما در تمامی گروههای تیمار شده با ۴-نونیل فنل و ۱۷بتا-

Archive of SID

www.SID.ir

استرادیول در مقایسه با گروه های کنترل و کنترل حلال بود (شکل ۳). در بررسی دیگری تزریق ۱۷بتا-استرادیول (۲ میکروگرم برگرم) و ۴-نونیل فنل (۱۵۰ میکروگرم بر-گرم) به سالمون آتلانتیکی (*Salmo salar*) پس از ۱۴ روز منجر به افزایش همزمان کلسیم کل پلاسما و ویتلوژنین شد که بطور آشکاری سنتز کبدی ویتلوژنین را نشان می داد (۲۶).

کلسیم به گروههای فسفات مولکول ویتلوژنین متصل می باشد (۳۰)، از اینرو انتظار می‌رفت همراه با افزایش غلظت ALP، سطوح کلسیم نیز در پلاسما افزایش یابد. در مطالعه حاضر نیز یک همبستگی مثبت و قوی بین غلظت های ALP و کلسیم کل پلاسما مشاهده شد (شکل۴). Verslycke و همکاران (۲۰۰۲) هم بطور مشابهی یک افزایش معنی‌دار را در سطوح کلسیم، ALP و پروتئین کل پلاسمای قزل آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) که با دوزهای مختلف از ۱۷آلفا-اتینیل استرادیول (17α-Ethinylestradiol) تزریق شده بودند را در مقایسه با ماهیان کنترل و کنترل حلال نشان دادند. تمامی این پارامترها بطور معنی داری با یکدیگر همبستگی داشتند (۴۲).

به عنوان یک نتیجه کلی، القاء شدن سنتز ویتلوژنین با افزایش متابولیسم کبد منجر به بزرگ شدن اندازه آن و متعاقبا افزایش شاخص هپاتوسوماتیک می‌گردد (۲۱). در یک بررسی شاخص هپاتوسوماتیک ماهی *Tautogolabrus adspersus* تیمار شده با ۱۷بتا-استرادیول (۲ و۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بعد از ۴ هفته بطور معنی داری افزایش یافت (۳۱). با این حال Pait و همکاران (۲۰۰۳) افزایش معنی‌داری را در شاخص هپاتوسوماتیک *Fundulus heteroclitus* تزریق شده با ۳ ماده استروژنیک ۴-نونیل فنل، ۴-(ترت-اوکتیل فنل) (4-(tert-octyl)Phenol) و بیس فنل-آ (Bisphenol-A)، مشابه با دوزهای به کار رفته در آزمایش حاضر، مشاهده نکردند (۳۲). همچنین با وجود سنتز ویتلوژنین در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، که به مدت ۲۸ تا ۳۱ روز در معرض ۵/۴-۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر از نونیل فنل قرار گرفته بودند، اختلاف معنی‌داری در HSI میان تیمارهای مختلف گزارش نگردید (۴۳). با این وجود نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش شاخص هپاتوسوماتیک همراستا با افزایش دوز ۴-نونیل فنل بود (شکل ۵). علاوه براین HSI در ماهیان تیمار شده با ۲ میکروگرم برگرم از ۱۷بتا-استرادیول، مشابه با ماهیانی که دوزهای بالای نونیل فنل را دریافت کرده بودند افزایش یافت (جدول ۱). از اینرو بنظر می رسد که ۴-نونیل فنل به وسیله عملکردی مشابه با ۱۷بتا-استرادیول اما با قدرت کمتر قادر به تحریک کبد به منظور سنتز ویتلوژنین و در نهایت افزایش اندازه آن می باشد. این افزایش در HSI به احتمال زیاد ناشی از تکثیر دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی جهت تولید و تغییر ویتلوژنین است که هایپرپلازی (Hyperplasia) (افزایش در تعداد سلول ها) و یا هایپرتروفی (Hypertrophy) (بزرگ شدن بیش از اندازه سلول ها) سلول های کبدی را به دنبال دارد (۲).

نتیجه گیری نهایی

نتایج بررسی حاضر نشان داد که نونیل فنل قادر به تحریک سنتز ویتلوژنین در جنس نر نابالغ ماهی شانک زرد باله است بطوریکه سطوح ویتلوژنین بطور معنی‌داری در ماهیان تیمار شده با دوزهای مختلف از این ترکیب افزایش یافت. این افزایش در ماهیان تیمار شده با ۱۷بتا-استرادیول نیز قابل مشاهده بود. همچنین نونیل فنل و ۱۷بتا-استرادیول اثرات مشابهی را بر روی کبد ایجاد کردند. از اینرو احتمالاً اثرات مشاهده شده ناشی از توانایی نونیل فنل در اعمال اثر استروژیک بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، انجام مطالعه محیطی بر روی ترکیبات مختل کننده اندوکرینی به ویژه نونیل فنل و اثرات آن بر روی ماهیان و سایر آبزیان منطقه خورموسی ضروری بنظر می

Archive of SID

www.SID.ir

رسد. در این میان ماهیان هرمافرودیت همانند شانک زردباله با دارا بودن مرحله حساس تمایز جنسی، از اهمیت بیشتری جهت مطالعه نسبت به سایر گونه ها برخوردار می باشد.

تشکر و قدر دانی

بخشی از این مطالعه با حمایت مالی مرکز پژوهش پتروشیمی بندر امام خمینی (ره) صورت پذیرفته است. نویسندگان مقاله‌ی حاضر بر خود لازم می دانند از آقایان رضا صحراییان، احمد غبیشاوی و احمد نگین تاجی که در انجام مراحل مختلف این تحقیق ما را یاری نمودند تقدیر نمایند.

منابع

1. Ahel, M., Giger, W., and Schaffner, C., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research.* 28, 1143-152.
2. Arukwe, A., and Goksoyr, A., 1998. Xenobiotics, Xenoestrogens and Reproduction Disturbances in Fish. *Sarsia*. 83, 225-241.
3. Bjornsson, B. T., and Haux, C., 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17β treated rainbow trout. *Jornal of Comparative Physiology*. 155 B, 347-352.
4. Burzawa-Gerard, E., and Dumas-Vidal, A., 1991. Effects of 17β-estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized european silver eel (*Anguilla anguilla*) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. *General Comparative Endocrinology*. 84, 264-276.
5. Carragher, J. F., and Sumpter, J. P., 1991. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. A 99, 169-172.
6. Casini, S., Fossi, M. C., Mori, G., and Bjornstad, A., 2002. Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17β-estradiol and 4-nonylphenol. *Environmental Monitoring and Assessment*. 75, 235-239.
7. Christensen, L. J., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology*. 46, 211-219.
8. Christiansen, T., Korsgaard, B., and 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. Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J., and Green, L., 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology.* 8, 385-398.
10. Flouriot, G., Pakdel, F., and Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Jornal of Molecular Endocrionology*. 15, 143-151.
11. Follett, B. K., and Redshaw, M. R., 1974. The physiology of vitellogenesis. In: Lofts B (ed) Physiology of the amphibia, vol 2. Academic Press, New York PP: 219-308.
12. Giesy, J. P., Pierens, S. L., Snyder, E. M., Miles-Richardson, S. M., Kramer, V. J., Snyder, S. A., Nichols, K. M., and Villeneuve, D. L., 2000. Effects of 4-nonyl phenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 1368-1377.
13. Gillespie, D. K., and Peyster, A. D., 2004. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 58, 90-95.
14. Hallgren, P., Martensson, A., and Mathiasson, L., 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin via alkali-labile phosphate in fish plasma-a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 89, 1023-1042.
15. Heppell, S. A., Denslow, N. D., Folmar, L. C., and Sullivan, C. V., 1995. Universal Assay of Vitellogenin as a Biomarker for Environmental Estrogens. *Environmental Health Perspective*. 103, 9-15.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Hesp, S. A., Potter, I. C., and Hall, N. G., 2004. Reproduction biology and protandrous experimental or field exposure in the gills and the hermaphroditism in *Acanthopagrus latus. Environmental Biology of Fishes*. 70, 252-272.

17. Jobling, S., Sheahan, D. A., Osborne, J. A., Matthiessen, P., and Sumpter, J. P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15, 194-202.

18. Jobling, S., and Sumpter, J. P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. 27, 361-372.

19. Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., and Jespersen, A., 2000. Effects of nonylphenol and 17β-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish (*Xiphophorus maculates*). *Jornal of Expreimental Biology*. 203, 171-181.

20. Korsgaard, B., Emmersen, J., and Petersen, I. M., 1983. Estradiol induced hepatic protein synthesis and transaminase activity in the male flounder (*Platichthys flesus*). *General Comparative Endocrinology.* 50, 11-17.

21. Korte, J. J., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Pasha, M. S., Parks, L. G., LeBlanc, G. A., and Ankley, G. T., 2000. Fathead minnow vitellogenin: Complementary DNA sequence and messenger RNA and protein expression after 17β-estradiol treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 19,972-981.

22. Kramer, V. J., Richardson, S. M., Pierens, S. L., and Giesy, J. P., 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17β-estradiol. *Aquatic Toxicology.* 40, 335-360.

23. Lee, H. B., 1999. Review of analytical methods for the determination on nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Quality Research Journal of Canada*. 34, 3-35.

24. Maguire, R. J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments*. Water Quality Research Journal of Canada*. 34, 37-78.

25. McCormick, S. D., O'Dea, M. F., Moeckel, A. M., Lerner, D. T., and Bjornsson, B. T., 2005. Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17β-estradiol. *General Comparative Endocrinology.* 142, 280-288.

26. Meucci, V., and Arukwe, A., 2005. Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology*. 73, 1-10.

27. Mills, L. J., and Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?. *Science of the Total Environment.* 343,1-34.

28. Mills, L. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Haebler, R. A., Horowitz, D. J. B., Jayaraman, S., Pruell, R. J., McKinney, R. A., Gardner, G. R., and Zaroogian, G. E., 2001. Effects of estrogenic (*o,p*-DDT; octylphenol) and antiandrogenic (*p,p*-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*. 52,157-176.

29. Mommsen, T. P., and Walsh, P. J., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. XI. The Physiology of Developing Fish, Part A. Academic Press, NewYork, PP: 347-405.

30. Monteverdi, G. H., and Di Giulio, R. T., 1999. An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocytes cultures from the channel catfish (*Octalurus punctatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 37, 355-375.

31. Pait, A. S., and Nelson, J. O., 2003. Vitellogenesis in male (*Fundulus heteroclitus*) (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquatic Toxicology*. 64, 331-342.

32. Purdom, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., and Sumpter, J. P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemical Ecology*. 8, 275-285.

33. Sa, R., Pousao-Ferreira, P., and Oliva-Teles, A., 2006. Effect of dietary protein and lipid levels on growth nickel on glycogen reserves and protein levels in and feed utilization of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*. 12, 310-321.

34. Segner, H., Navas, J. M., Schafers, C., and Wenzel, A., 2003. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo.

Archive of SID

www.SID.ir

Ecotoxicology and Environmental Safety. 54, 315-322.

35. Snyder, S. A., Keith, T. L., Pierens, S. L., Snyder, E. M., and Giesy, J. P., 2001. Bioconcentration of nonylphenol in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Chemosphere*. 44, 697-702.

36. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., and Lester, J. N., 2008. Nonylphenol in the environment, A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*. 34, 1033-1049.

37. Soto, A. M., Justica, H., Wray, J. W., and Sonnenshein, C., 1991. *p*-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environmtal Health Perspective.* 92, 167-173.

38. Thomas, K. V., Balaam, J., Hurst, M. R., and Thain, J. E., 2004. Identification of in vitro estrogen and androgen receptor agonists in North Sea offshore produced water discharges. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 1156-1163.

39. Tyler, C. R., Sumpter, J. P., and Bromage, N. R., 1988. In vivo uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Jornal of Experimental Zoology*. 246, 171-179.

40. Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., and Viana, M. T., 2005. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Apply Ecology and Environment Research*.4,1-25.

41. Verslyke, T., Vandenbergh, G. F., Versonnen, B., Arijs, K., and Janssen, C. R., 2002. Induction of vitellogenesis in 17α-ethinylestradiolexposed rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry Physiology*. 132 C, 483-492.

42. Villeneuve, D. L., Villalobos, S. A., Keith, T. L., Snyder, E. M., Fitzgerald, S. D., and Giesy, J. P., 2002. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*. 47, 15-28.

43. White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., and Parker, M. G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* 13, 175-182.

Archive of SID

www.SID.ir

The estrogenic effect of 4-nonylphenol on vitellogenin synthesis in the immature male yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Teleostei: Sparidae) (Houttuyn, 1782)

Naderi M.[1], Safahieh A.R.[1], Dehghan Madiseh S.[2], Zolgharnin H.[2], Rajabzade Ghatrami E.[3] and Eidivand S.[4]

[1] **Marine Pollution Dept., Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran**

[2] **Marine Biology Dept., South Iranian Aquaculture Research Center, Khorramshahr, I.R. of Iran**

[3] **Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran**

[4] **Research center of Imam Khomaini Port Petrochemical Complex, Imam Khomaini Port, I.R. of Iran**

Abstract

In the present study effects of estrogenic compound 4-nonylphenol was investigated on vitellogenin synthesis in the immature male yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). The fish received intraperitoneal injections during a period of two weeks with 10, 50, 100, 150 and 200 µg g^{-1} $week^{-1}$ of 4-nonylphenol. One of the treatments also injected with 2 µg g^{-1} $week^{-1}$ of 17β-estradiol. Solvent controls received the ethanol-coconut oil only, whereas controls were not injected. The fish were sampled on day 0, 7 and 14. The induction of VTG in plasma of treated fish was determined indirectly by measuring the alkali-labile phosphate and total plasma calcium. Increased concentrations of these indicators indicated a dose–response induced synthesis of vitellogenin in the liver of the 4-nonylphenol-treated seabreams. Induction of vitellogenin synthesis also could be observed by increasing the hepatosomatic index (HSI) in the 4-nonylphenol-treated fish. The findings of this study showed the potency of nonylphenol to exert esterogenic effect as indicated by both increase in vitellogenin synthesis and HSI.

Key words: 4-Nonylphenol; Vitellogenin; Alkali labile phosphate ALP; 17β-Estradiol; Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)

Archive of SID

www.SID.ir