Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۴

مطالعه ویتلوژنین القا شده در پلاسمای جنس نر ماهی حوض به عنوان بیومارکر مواجهه با برهم زننده‌های اندوکرینی

الهام عبدزاده[۱]، بهروز حیدری[۲]*، رضا حسن ساجدی[۳]

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۴ تاریخ پذیرش: تیر ۹۴

چکیده

ماهی حوض (*Carassius auratus auratus*) از ماهیان آب شیرین و جزء اولین ماهیان اهلی شده و آکواریومی به حساب می‌آید. به منظور مطالعه میزان ویتلوژنین القاء شده پلاسما در این ماهی، از تیمارهای ۱۷بتا- استرادیول، بیس فنول A (BPA)، نفتالن و بوتاکلر استفاده شد. بررسی حاضر طی دو مرحله مجزا انجام گرفت. در مرحله نخست، تیمارهای BPA، نفتالن و بوتاکلر با دوزهای ۵۰۰µg/L، ۲۰۰µg/L، ۰/۲۸µL/L طی مدت ۱۵ روز به آکواریوم‌های حاوی ماهی حوض اضافه شدند و خون‌گیری در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم انجام شد. در مرحله دوم، تیمارهای ۱۷بتا- استرادیول، BPA، نفتالن و بوتاکلر به ترتیب با دوزهای ۰/۵mg/mL، ۵۰mg/Kg، ۵۰mg/Kg و ۲۰µL، مستقیما به ماهی‌ها تزریق شدند و پس از ۴۸ ساعت خون‌گیری صورت گرفت. بعد از جداسازی پلاسما، با استفاده از تست ALP میزان فسفات و ویتلوژنین هر یک از تیمارها اندازه‌گیری و محاسبه شد. نتایج به دست آمده از مرحله اول نشان داد بین مقادیر ویتلوژنین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). در بین تیمارها ابتدا ۱۷بتا- استرادیول و سپس BPA بیش‌ترین میزان ویتلوژنین را به خود اختصاص دادند. از لحاظ آماری بین دو تیمار نفتالن و بوتاکلر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مرحله دوم، نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵)، در حالی که بین دو تیمار BPA و نفتالن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی BPA، نفتالن و بوتاکلر با القاء ساخت ویتلوژنین در هر دو مرحله آزمایش، نشان دادند که می‌توانند به عنوان EDC در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: *۱۷بتا- استرادیول، بیس فنول A، نفتالن، بوتاکلر، ALP، EDC*

۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا،گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران **و** گروه علوم دریایی پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: bheidari@guilan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اصطلاح ویتلوژنین (Vtg) برای اولین بار توسط Pan و همکاران در سال ۱۹۶۹ برای توصیف پروتئین ویژه جنس ماده در همولنف حشره *Cecropia moth* به کار برده شد. Hara و Hirai در سال ۱۹۷۶ پروتئین سرمی ویژه جنس ماده (FSSP[1]) را درماهی آزاد چام[2] و قزل‌آلای رنگین‌کمان[3] کشف کردند. این پروتئین بعد از تخلیص، برای اولین بار در ماهیان استخوانی به عنوان ویتلوژنین معرفی شد (Hiramatsu et al., 2006). ویتلوژنین، پروتئین پیش‌ساز زرده، گلیکوفسفولیپوپروتئینی[4] با وزن مولکولی بالا است که در پاسخ به هورمون ۱۷بتا- استرادیول[5] در کبد ساخته شده، پس از رهاسازی به خون، توسط اووسیت جذب می‌شود (Watts et al., 2003). ویتلوژنین به عنوان پروتئین چندکاره، انتقال دهنده واحدهای اصلی سازنده جهت رشد اووسیت از قبیل پروتئین، لیپید، فسفات و کربوهیدرات از کبد به اووسیت است (Rocha et al., 2008).

تاکنون ویتلوژنین در بسیاری از ماهیان، به وسیله روش‌های مختلف ایمنولوژیکی و بیوشیمیایی تخلیص، شناسایی و تعیین ویژگی شده است. به طور کلی همه ویتلوژنین‌ها دارای ویژگی‌های مشترک به شرح زیر هستند:

۱) پروتئین سرمی یا پلاسمایی ویژه جنس ماده هستند.

۲) پروتئین پیش ساز زرده هستند.

۳) ساخت آن‌ها توسط استروژن‌ها القا می‌شود.

۴) گلیکوفسفولیپوپروتئینی با وزن مولکولی بین ۳۰۰-۶۰۰ کیلودالتون هستند.

۵) پروتئین‌های حامل لیپید و ترکیبات یونی از قبیل کلسیم، روی، کادمیوم و آهن هستند (Hiramatsu et al., 2006).

پروتئین پیش‌ساز زرده، ویتلوژنین، پس از ساخته شدن، در کبد تحت فرآیندهایی مانند لیپیدی شدن، فسفریله شدن و گلیکوزیله شدن قرار می‌گیرد (Bieberstein et al., 1999) و پس از آزاد شدن به جریان، خون توسط اووسیت در حال رشد جذب می‌شوند (Hiramatsu et

1- Female-specific Serum Protein
2- Chum Salmon) Oncorhynchus *keta*)
3- Rainbow Trout (*O. mykiss*)
4- Glycophospholipoprotein
5- 17β-Estradiol

www.SID.ir

Archive of SID

al., 2006). به این ترتیب که ویتلوژنین از طریق مویرگ‌ها وارد لایه تکای فولیکولی تخمدان می‌شود، سپس از طریق غشای پایه که جداکننده سلول‌های تکا و گرانولوزا است وارد فضاهای بین سلولی لایه سلولی گرانولوزا می‌شود و نهایتا از طریق زونارادیاتا (پوشش زرده) در تماس با اوولما قرار می‌گیرد (Patino and Sullivan, 2002). جذب ویتلوژنین در اووسیت‌های در حال رشد ماهی، از طریق آندوسیتوز با واسطه گیرنده[1] صورت می‌گیرد (Stifani et al., 1990). درون اووسیت، ویتلوژنین پس از فرآیندهای آنزیمی به پروتئین‌های زرده که در نهایت به شکل گرانول‌ها یا پلیت‌های زرده در اووپلاسم ذخیره می‌شوند، تبدیل می‌شود (Hiramatsu et al., 2006).

تولیدمثل به میزان زیادی تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و به وسیله مکانیسم تنظیم نورواندوکرینی که از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی عمل می‌کند انجام می‌شود (Weltzien et al., 2004).

بسیاری از ترکیبات شیمیایی تولید شده در قرن اخیر توانایی تأثیر بر سیستم نورواندوکرینی مهره‌داران را که تنظیم کننده فرآیندهای حیاتی مانند، رشد، متابولیسم و تولیدمثل است، دارند. به طور کلی ترکیباتی که تقلید کننده یا مهار کننده[2] عمل طبیعی هورمون‌ها هستند، برهم زننده‌های اندوکرینی (EDCs[3]) نامیده می‌شوند (Hiramatsu et al., 2006). این ترکیبات در بسیاری از محصولات مورد استفاده روزانه مانند: بطری‌های پلاستیکی، قوطی‌های فلزی غذا، شوینده‌ها، غذاها، اسباب بازی‌ها، وسایل آرایشی و آفت‌کش‌ها وجود دارند. شواهد نشان می‌دهد بسیاری از جانداران آبزی، مقدار قابل توجهی از ترکیبات شیمیایی سنتزی و طبیعی را به عنوان EDC دریافت می‌کنند که می‌توانند تهدید کننده سلامت دستگاه تولیدمثلی جمعیت‌های ماهی باشند. منابع ورود EDCs شامل فاضلاب های شهری و برخی از فاضلاب‌های صنعتی هستند. پژوهش‌ها نشان داده است که وجود EDCs نه تنها در محیط می‌تواند اثرات مضری بر گونه‌های حیات وحش داشته باشد بلکه در دوزهای پایین آزمایشگاهی نیز تأثیرگذار است (Hutchinson et al., 2006).

BPA جزء دی‌فنیل آلکان‌ها[4] و ماده اولیه تولید پلیمرهایی مانند پلی‌کربنات‌ها، رزین‌های

1- Receptor-mediated Endocytosis
2- Mimic and Antagonize
3- Endocrine Disrupting Chemicals
4- Diphenyl Alkane

www.SID.ir

Archive of SID

اپوکسی و فنولیک[1] پلی‌استرها و پلی‌آکریلات‌ها[2]است. همچنین BPA به صورت تجاری در دندان پزشکی (در ساختار Sealant)، صنایع پلاستیک‌سازی (بطری‌های آب، شیشه شیر نوزادان، بسته‌بندی‌های غذایی، دیسک‌های فشرده، لنزهای عینک و اسباب بازی‌ها) و صنایع غذایی (قوطی‌های غذا و درپوش بطری‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد و با ورود به فاضلاب‌های صنعتی باعث اختلال در سیستم نوروآندوکرینی موجودات آبزی می‌شود (Lv et al., 2007).

بوتاکلر به عنوان یکی از رایج‌ترین علف‌کش‌ها، برای کنترل علف‌های هرز مزارع برنج مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این که اکثر زمین‌های کشاورزی در مسیر رودخانه‌ها واقع شده‌اند زهاب آلوده شده توسط آفت‌کش می‌تواند بر تولیدمثل و ویژگی‌های فیزیولوژیکی ماهی‌هایی که برای تخم‌ریزی به این مناطق مهاجرت می‌کنند تأثیرگذار باشد (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۱).

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)[3]به عنوان برهم‌زننده‌های اندوکرینی شناخته شده‌اند که نفتالن یکی از سبک‌ترین نوع آن‌ها است و در زغال‌سنگ و قیر به وفور یافت می‌شود. نفتالن توسط فرآیندهای تبلور و تقطیر از قیر به دست می‌آید (Cooper and Kavlock, 1997). فاضلاب پالایشگاه‌ها، تولیدات نفتی و مواد شیمیایی، ترافیک‌های دریایی، گازوئیل و روغن از راه‌های ورود نفتالن به محیط است. در نتیجه نفتالن در خاک، رسوب، آب‌های سطحی و عمقی یافت می‌شود (Pollino et al., 2009).

از اندازه‌گیری پروتئین‌های قابل تنظیم توسط استروژن، اغلب برای تشخیص مواجهه حیوانات با EDCs استروژن‌زا استفاده می‌شود و ویتلوژنین بارها برای این تشخیص مورد استفاده قرار گرفته است (Hiramatsu et al., 2006). مطالعات آزمایشگاهی و محیطی ارزش ویتلوژنین را به عنوان یک بیومارکر القاء شونده سریع توسط استروژن‌ها و آنتی‌استروژن‌ها در ماهیان بالغ و نابالغ اثبات کرده‌اند. ویتلوژنین به طور طبیعی در پلاسمای ماهیان ماده دیده می‌شود که در پاسخ به استروژن داخلی ساخته می‌شود. ماهیان نر نیز حاوی ژن ویتلوژنین هستند. ژن ویتلوژنین می‌تواند در معارضه با استروژن‌های خارجی بیان شده، منجر به ساخت

1- Epoxy and Phenolic Resin
2- Polyacrylate
3- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

www.SID.ir

Archive of SID

ویتلوژنین در افراد نر شود (Hutchinson et al., 2006). بر این اساس پژوهش حاضر اثرات ترکیبات BPA، نفتالن و بوتاکر را به عنوان EDC در القاء ساخت ویتلوژنین در جنس نر ماهی حوض مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شرایط نگهداری

نمونه‌های ماهی حوض (*Carassius auratus auratus*) نر از یک استخر پرورشی در جاده جیرده- شفت تهیه شدند و به آزمایشگاه زیست‌شناسی دریای دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان انتقال یافتند. با توجه به این که نمونه‌برداری در فصل تولیدمثل انجام شد، ماده‌ها به دلیل داشتن سطح شکمی متورم‌تر از نرها که بدنی باریک و کشیده داشتن قابل تفکیک بودند. ماهیان نر پس از جداسازی به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش برای سازگار شدن، تحت شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند. سپس ماهی‌ها (وزن ۱۷/۴g±۶۵/۳ و طول ۱/۲cm±۱۵/۷) به آکواریوم‌های ۷۰ لیتری حاوی آب چاه منتقل شدند. در هر آکواریوم ۱۲-۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد (جهت اطمینان از نر بودن نمونه‌ها، در پایان دوره تیمار، نمونه‌ها تشریح شدند و نر بودن آن‌ها تایید شد).

در طول دوره تیمار، آب آکواریوم ها هر سه روز یک‌بار تعویض و ماهی‌ها توسط غذای آماده تغذیه می‌شدند. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما (با دماسنج)، اکسیژن (با اکسیژن‌متر مدل ECDO602K، Eutech Instrument، سنگاپور) و pH (با pHمتر مدل ECPH502PLUSK، Eutech Instrument، سنگاپور) نیز هر روز کنترل می‌شدند.

تیمارها

در مطالعه حاضر برای بررسی اثر برهم زننده‌های اندوکراینی بر میزان ویتلوژنین در ماهی حوض نر از ترکیبات بیس فنول A (BPA) ۹۹٪ (Sigma-Aldrich، آمریکا)، بوتاکلر ۶۰٪ (شرکت گل‌سم گرگان، ایران) و نفتالن (Merck-Schuchardt، آلمان) به همراه ۱۷بتا- استرادیول (E2؛ شرکت ابوریحان، ایران) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد و برای بررسی دقیق‌تر اثرات این ترکیبات، این مطالعه در دو مرحله جداگانه انجام گرفت.

مرحله اول: افزودن برهم زننده‌ها به آب آکواریوم‌های حاوی ماهی

www.SID.ir

Archive of SID

در این مرحله ترکیبات برهم زننده مورد مطالعه به سه آکواریوم حاوی ماهی حوض اضافه شدند و ماهیان به مدت ۱۵ روز در معرض آن‌ها قرار گرفتند. این ترکیبات شامل BPA ٪۹۹ به میزان µ۵۰۰g/L حل شده در اتانول (Lv et al., 2007) ، نفتالن به میزان µ۲۰۰g/L حل شده در اتانول (Pollino et al., 2009) و بوتاکلر ٪۶۰ به میزان ۰/۲۸µL/L (Wang et al., 1992) بودند که هر یک به آکواریوم های مجزا اضافه شدند. در طول دوره تیمار، این ترکیبات بعد از هر بار تعویض آب، مجددا به آب آکواریوم اضافه می‌شدند. همچنین نرهای بدون تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. خون‌گیری از ماهی‌ها در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم تیمار با استفاده از سرنگ‌های حاوی EDTA[1] از رگ پشتی، از محل باله مخرجی انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ (۳۰۰۰g در ۱۰ دقیقه) نمونه‌های خون، پلاسمای آن‌ها جدا شد و برای انجام مراحل بعدی آزمایش در ۲۰°C- نگهداری شد.

مرحله دوم: تزریق برهم زننده‌ها به ماهی‌ها

در این مرحله، از چهار آکواریوم، هر یک با ۱۲-۱۰ نمونه استفاده شد و ترکیب در نظر گرفته شده برای هر آکواریوم به ماهیان آن تزریق شد. بدین ترتیب که هر گروه از ماهیان یکی از ترکیبات ۱۷بتا- استرادیول حل شده در روغن ذرت به مقدار ۰/۵mg/mL (Sun et al., 2003)، BPA ٪۹۹ حل شده در اتانول به مقدار ۵۰mg میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (Lv et al., 2007)، نفتالن حل شده در اتانول به مقدار ۵۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (Tintos et al., 2006) و یا بوتاکلر ٪۶۰ به مقدار ۲۰µL (Wang et al., 1992) از طریق تزریق درون‌صفاقی دریافت کردند. تیمار ۱۷بتا- استرادیول به عنوان شاهد مثبت و نرهای بدون تیمار به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. خون‌گیری پس از ۴۸ ساعت انجام شد و پلاسمای جدا شده مطابق مرحله قبل نگهداری شد.

سنجش ویتلوژنین به روش ALP[2]

این مرحله که بر اساس پروتکل Hallgren و همکاران (۲۰۰۹) انجام گرفت روشی است که طی آن فسفات موجود در ساختار ویتلوژنین آزاد و پس از ورود به داخل پلاسما به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین ALP روشی غیرمستقیم در سنجش میزان

1- Ethylenediaminetetraacetic Acid

2- Alkali-labile Phosphate

www.SID.ir

Archive of SID

ویتلوژنین است. بدین منظور ابتدا میزان فسفات نمونه‌ها سنجش شده و سپس بر اساس آن ویتلوژنین محاسبه می‌شود.

طبق پروتکل، به ۱۰۰µL از پلاسما ۴۵µL استن اضافه شد و پس از مخلوط شدن توسط ورتکس، در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ (Hettich Rotanta 460R، آلمان) شد. بعد از خارج کردن محلول رویی، به رسوب باقی مانده ۳۰۰µL بافر تریس اضافه شد و پس از ورتکس ۱۶۲µL استن اضافه شد و سریعا ورتکس شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور g۵۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ و محلول رویی خارج شد. در این مرحله شستشوی دوم رسوب باقی مانده توسط ۳۰۰µL اتانول و ۱۶۲µL استن پس از سانتریفیوژ در دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C انجام شد. پس از خارج کردن محلول رویی، برای رسوب باقی مانده از ۱۰۰µL NaOH یک مولار به عنوان تیمار آلکالین استفاده شد و پس از ورتکس، نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۷۰°C آنکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون و رسیدن دمای نمونه به دمای اتاق، ۴۰µL تری‌کلرواستیک اسید به نمونه اضافه شد و پس از ورتکس، در دور g۲۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۵µL از محلول رویی به تیوپ جدید انتقال یافت و پس از اضافه کردن آب مقطر و ۱- بوتانول هر یک به مقدار ۴۳۵µL و ورتکس کردن، در دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ، محلول به دو فاز شامل فاز رویی بوتانولی و فاز زیری آبی تقسیم شد. از پایین‌ترین فاز آبی دو قسمت ۱۴۵µL جدا شد و به تیوپ‌های جداگانه منتقل شد. به تیوپ اول ۵۰µL مولیبدات و ۵۰µL اسید آسکوربیک و به تیوپ دوم ۵۰µL مولیبدات و ۵۰µL آب اضافه شد. پس از ۶۰ ثانیه تکان دادن با دست، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰°C آنکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۶۳۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SQ-4802، UNICO، آمریکا) خوانده شد و میزان فسفات آن‌ها بر اساس منحنی استاندارد محاسبه شد (Hallgren et al., 2009).

برای تعیین مقدار ویتلوژنین، ابتدا غلظت ویتلوژنین تخلیص شده از تیمار ۱۷بتا-استرادیول به وسیله تست بردفورد اندازه‌گیری شد (۰/۰۵ mg/mL)، سپس نسبت بین غلظت ویتلوژنین و فسفات اندازه‌گیری شده در همان تیمار به دست آمد و نسبت حاصله برای سایر تیمارها اعمال شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

www.SID.ir

Archive of SID

پس از محاسبه میزان فسفات و ویتلوژنین، معنی‌داری میزان تغییرات پارامترها در هر یک از تیمارها طی دوره آزمایش و همچنین بین تیمارهای مختلف توسط آزمون ANOVA یک‌طرفه و پس‌آزمون Dunnett با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. میانگین‌های پارامترها نیز به همراه خطای استاندارد (±SE) بیان شده‌اند. تمام آنالیزها توسط نرم افزار SPSS 19.0 و رسم نمودارها به وسیله نرم افزار Microsoft Excel تحت سیستم عامل WINDOWS 7 انجام شد.

نتایج

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب که در طی دوره آزمایش اندازه‌گیری شدند شامل دما، اکسیژن و pH بودند که مقادیر آن‌ها به ترتیب ۱۸±۲°C، ۸/۴±۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۸±۱ به دست آمد.

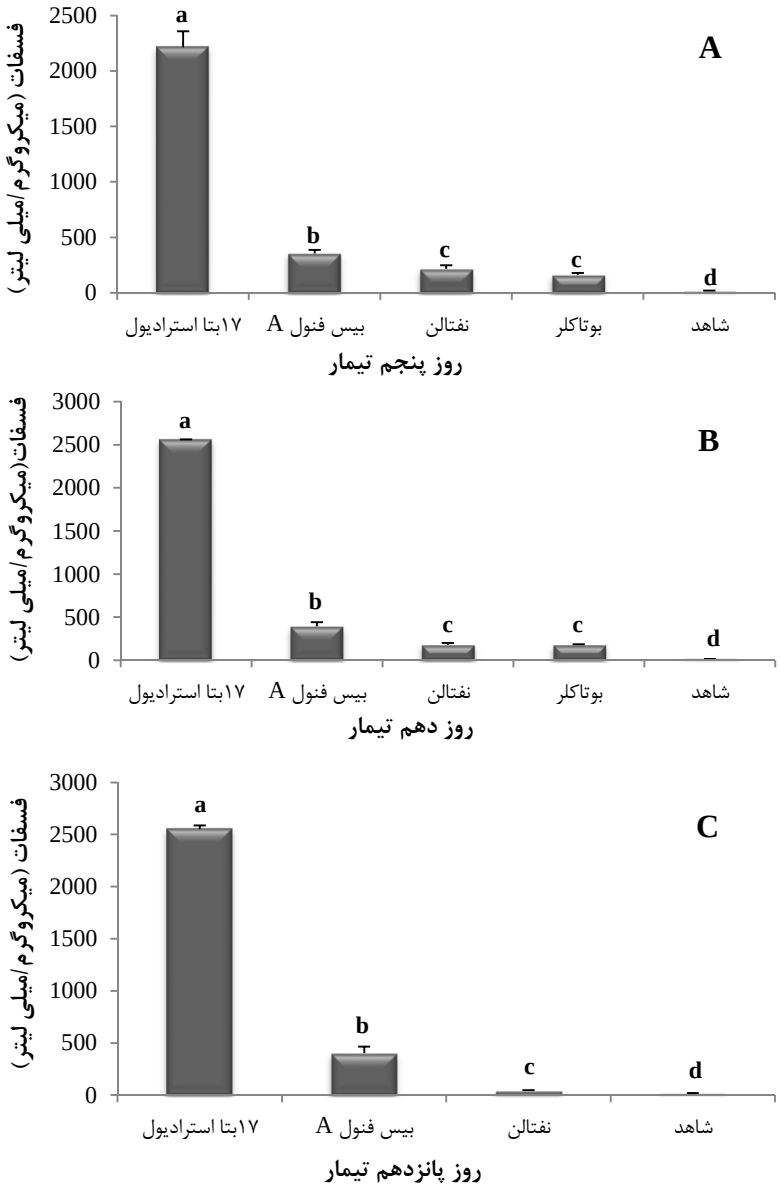
لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر نمودارهای مربوط به نتایج بر حسب مقادیر فسفات (PO_4^{-3}) تیمارها گزارش شده است (شکل‌های ۳-۱) و مقادیر ویتلوژنین که عینا روندی مشابه با فسفات داشت برای جلوگیری از تکرار، در جدول ۱ آورده شده است.

اثر افزودن برهم زننده‌ها به آب حاوی ماهی

در روز پنجم آزمایش، تیمار ۱۷بتا-استرادیول در مقایسه با سایر تیمارها و همچنین تیمار شاهد، بیش‌ترین میزان فسفات را به خود اختصاص داد (۱۴۴/۸± ۲۲۱۲/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر). با مقایسه مقادیر فسفات مربوط به تیمارهای BPA (۳۰/۸±۳۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر)، نفتالن (۳۲/۵±۲۱۵/۸میکروگرم در میلی‌لیتر) و بوتاکلر (۱۶/۵±۱۶۱/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) وجود سیر نزولی قابل مشاهده بود. از لحاظ آماری با وجود مشاهده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و نمونه شاهد (۱/۷±۱۷/۳۹ میکروگرم در میلی‌لیتر؛ P<۰/۰۵)، بین دو تیمار نفتالن و بوتاکلر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل 1A). در دهمین روز آزمایش نیز اختلاف معنی‌دار بین تیمارها و نمونه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). مانند روز پنجم، بین فسفات تیمار ۱۷بتا-استرادیول (۷/۷۵±۲۵۵۴/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) با سایر تیمارها و همچنین گروه شاهد (۱/۷±۱۷/۳۹ میکروگرم در میلی لیتر) از لحاظ آماری اختلاف معنی دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: تغییرات مقدار فسفات در تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. A: روز پنجم. B: روز دهم. C: روز پانزدهم (میانگین ± خطای استاندارد). وجود حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر فسفات محاسبه شده مربوط به تیمارهای BPA، نفتالن و بوتاکلر به ترتیب ۳۹۴/۲±۴۷/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۱۷۷/۷±۲۴/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۷۹±۸/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که بین تیمارهای نفتالن و بوتاکلر تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود نداشت (شکل 1B). در روز پانزدهم، بین سه تیمار ۱۷بتا- استرادیول (۲۵۵۴/۲±۳۴/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر)، BPA (۴۰۳/۹±۵۹/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نفتالن (۴۱/۸±۵/۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) و همچنین گروه شاهد (۱۷/۳۹±۱/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) از لحاظ آماری اختلاف معنی دار وجود داشت (P<۰/۰۵). نمونه‌های مربوط به تیمار بوتاکلر قبل از رسیدن به روز پانزدهم آزمایش از بین رفتند (شکل 1C).

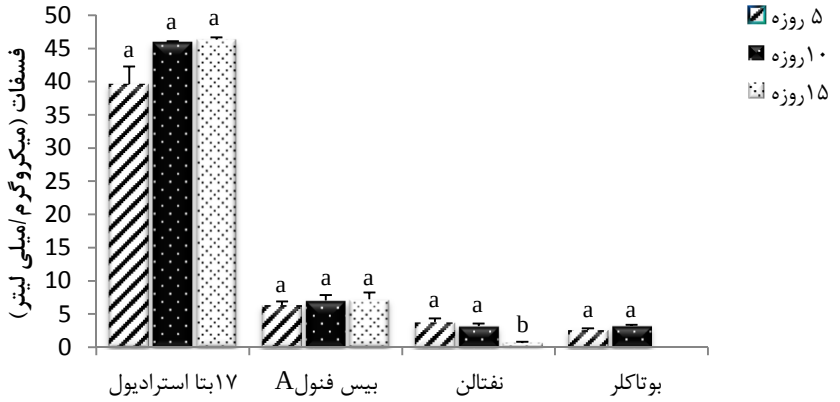
شکل ۲ تغییرات مربوط به هر یک از تیمارها را در طول دوره آزمایش به صورت مجزا نشان می‌دهد. بین روزهای پنجم، دهم و پانزدهم آزمایش در دو تیمار ۱۷بتا- استرادیول و BPA و روزهای پنجم و دهم تیمار بوتاکلر از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در حالی که روند صعودی در مقدار فسفات از روز پنجم به دهم در هر سه تیمار قابل مشاهده است. مقایسه مقادیر فسفات حاصل از تیمار نفتالن در طی دوره آزمایش روند نزولی را نشان داد. با این وجود از لحاظ آماری بین روزهای پنجم و دهم آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

اثر تزریق برهم زننده‌ها به ماهی‌ها

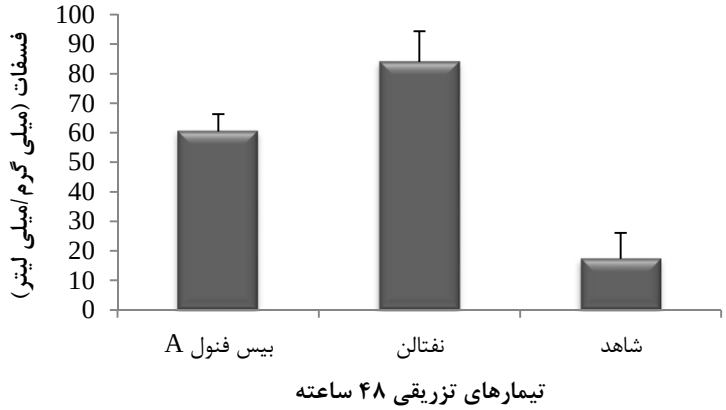
در آزمایش مرحله دوم، با وجود مشاهده اختلاف معنی‌دار بین گروه شاهد (۱۷/۳۹±۱/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) و تیمارها (P<۰/۰۵)، بین دو تیمار BPA (۶۰/۴±۵/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نفتالن (۸۴±۱۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نمونه‌های مربوط به تیمار بوتاکلر در طول آزمایش از بین رفتند (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: تغییرات مقدار فسفات در هر یک از تیمارها در طی دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف لاتین متفاوت در هر گروه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل۳: تغییرات مقدار فسفات در تیمارهای تزریقی پس از ۴۸ ساعت (میانگین ± خطای استاندارد). تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقادیر فسفات و ویتلوژنین تیمارها در طی دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

زمان نمونه‌برداری	تیمارها	فسفات (µg/mL)	ویتلوژنین (mg/mL)
روز پنجم	۱۷ بتا- استرادیول	۲۲۱۲/۱۴۴±۱/۸^{a}	۳۹/۲±۶/۶^{a}
	BPA	۳۰±۳۵۶/۸^{b}	۶/۰±۳/۵^{b}
	نفتالن	۲۱۵/۳۲±۸/۵^{c}	۳/۰±۸/۵^{c}
	بوتاکلر	۱۶۱/۱۶±۹/۵^{c}	۲/۰±۶/۱۶^{c}
روز دهم	۱۷ بتا- استرادیول	۲۵۵۴/۷±۸/۷۵^{a}	۴۵/۰±۹/۳۱^{a}
	BPA	۳۹۴/۴۷±۲/۹^{b}	۰±۷/۸^{b}
	نفتالن	۱۷۷/۲۴±۷/۷^{c}	۳/۰±۱/۴^{c}
	بوتاکلر	۸±۱۷۹/۱^{c}	۳/۰±۲/۱۵^{c}
روز پانزدهم	۱۷ بتا- استرادیول	۲۵۵۴/۳۴±۲/۶^{a}	۴۶/۰±۳/۷۳^{a}
	BPA	۴۰۳/۵۹±۹/۹^{b}	۷/۱±۲^{b}
	نفتالن	۴۱/۵±۸/۶۲^{c}	۰/۰±۷/۱^{c}
	بوتاکلر	-	-
۴۸ ساعت (تزریق)	BPA	۶۰/۵±۴/۹^{a}	۰±۱/۱^{a}
	نفتالن	۱۰±۸۴/۴^{a}	۱/۰±۴۸/۲^{a}

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقادیر فسفات و ویتلوژنین هر یک از تیمارها در طی دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

	زمان خون‌گیری	فسفات (µg/mL)	ویتلوژنین (mg/mL)
استرادیول	روز پنجم	۲۲۱۲/۱۴۴±۱/۸^{a}	۳۹/۲±۶/۶^{a}
	روز دهم	۲۵۵۴/۷±۸/۷۵^{a}	۴۵/۰±۹/۳۱^{a}
	روز پانزدهم	۲۵۵۴/۳۴±۲/۶^{a}	۴۶/۰±۳/۷۳^{a}
BPA	روز پنجم	۳۰±۳۵۶/۸^{b}	۶/۰±۳/۵^{b}
	روز دهم	۳۹۴/۴۷±۲/۹^{b}	۰±۷/۸^{b}
	روز پانزدهم	۴۰۳/۵۹±۹/۹^{b}	۷/۱±۲^{b}
نفتالن	روز پنجم	۲۱۵/۳۲±۸/۵^{c}	۳/۰±۸/۵^{c}
	روز دهم	۱۷۷/۲۴±۷/۷^{c}	۳/۰±۱/۴^{c}
	روز پانزدهم	۴۱/۵±۸/۶۲^{c}	۰/۰±۷/۱^{c}
بوتاکلر	روز پنجم	۱۶۱/۱۶±۹/۵^{c}	۲/۰±۶/۱۶^{c}
	روز دهم	۸±۱۷۹/۱^{c}	۳/۰±۲/۱۵^{c}
	روز پانزدهم	-	-

بحث

در این که وجود گستره وسیعی از مواد شیمیایی ساخته شده به دست بشر در محیط‌های آبی می‌تواند باعث ایجاد اختلال در سیستم اندوکرینی و تولیدمثلی موجودات شود تردیدی وجود ندارد. با توجه به این که اکثر استروژن‌های محیطی به طور اتفاقی کشف شده‌اند بنابراین تقسیم‌بندی سیستماتیکی برای ترکیبات دارای فعالیت استروژنی وجود ندارد (Tyler et al., 1996). به دلیل گسترده بودن فعالیت هورمون‌ها در بدن، برهم زننده‌های اندوکرینی می‌توانند باعث طیف وسیعی از اختلالات شوند که نه تنها بر سیستم اندوکرینی بلکه بر سیستم‌های رده‌های بالاتر مثل سیستم عصبی و ایمنی هم تاثیرگذار باشند. (Yamanaka et al., 1998). با اندازه‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

میزان ویتلوژنین در پلاسمای خون ماهی نر امکان درک اثرات استروژن‌های محیطی بر موجودات آبزی فراهم خواهد شد.

اثر افزودن برهم زننده‌ها به آب حاوی ماهی

در ماهی‌ها استروژن‌ها نه تنها مسئول القا ساخت ویتلوژنین هستند بلکه در تمایز و بلوغ جنسی و همچنین تحریک سلول‌های کبدی در ساخت پروتئین‌های پوشش زرده نقش اساسی ایفا می‌کنند. بنابراین در ماهی‌ها، وجود استروژن‌ها جهت تشکیل تخم و تولید زرده برای جنین در حال رشد ضروری است. مهم‌ترین استروژن‌های موجود در ماهی‌ها ۱۷بتا- استرادیول، استرون[1] و استریول[2] است. میزان استروژن‌های موجود در گردش خون، همچنین زمان ورود آن‌ها توسط محور هیپوتالاموس- هیپوفیز-گنادی کنترل می‌شود. مواجهه نامناسب با این استروژن‌ها در مراحل بحرانی از چرخه زندگی و یا در غلظت‌های نامشخص می‌تواند اثرات مخربی بر چرخه تولیدمثلی ماهی‌ها داشته باشد (Di Giulio and Hinton, 2008).

حد آستانه غلظت ۱۷بتا- استرادیول که موجب بروز پاسخ می‌شود در بین خانواده‌های مختلف متفاوت است. این حد برای خانواده‌های سالمونیدها و کپورماهیان مشابه و بین µg/L ۲۵ تا ۵۰ است. لازم به ذکر است که اثر تحریکی ۱۷بتا- استرادیول در ساخت ویتلوژنین یک فرآیند وابسته به دوز و زمان است و در بین خانواده‌های مختلف و حتی افراد مربوط به یک خانواده می‌تواند متفاوت باشد (Sun et al., 2003).

معارضه آبی جنس نر لوچ چینی[3] ۱۷بتا- استرادیول در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵µg/L در طی ۴۲ روز نتایج متفاوتی را نشان داد، به طوری که غلظت‌های ۱ و ۵µg/L از ۱۷بتا- استرادیول بعد از ۷ روز موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۱۸/۱۲±۲/۲ و g/mL ۲۱۱/۹۳±µ۰۶/۲۷ شده است در حالی که زمان مورد نیاز جهت بروز پاسخ در غلظت ۰/۵µg/L از ۱۷بتا- استرادیول، ۱۴ روز (۴۳/۰۴±µ۴۶/۰g/mL) و غلظت ۰/۱µg/L، ۳۵ روز (۵۰/۰۵±µ۱۱/۱۹g/mL) پس از معارضه بود (Lv et al., 2007). در پژوهشی دیگر که توسط Shao و همکاران (۲۰۰۷) بر

1- Strone
2- Estriol

3- Chinese Loach

www.SID.ir

Archive of SID

روی این گونه صورت گرفت تزریق ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از ۱۷بتا- استرادیول پس از ۲۱ روز موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۲/۹±۰/۷µg/mL شد. میزان ۱/۶mg/Kg به ازای وزن بدن ۱۷بتا- استرادیول، در طی دو هفته موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۴۳/۴۵ mg/mL در جنس نر ماهی سیم دریایی[1] ۱۷/۶mg/mL در جنس نر ماهی Black porgy و ۴۵/۳ mg/mL در جنس نر ماهی Skew band grunt شد (Wu et al., 2003). در این مطالعه، در ماهی حوض میزان ویتلوژنین القاء شده توسط ۱۷بتا- استرادیول با غلظت ۰/۵mg/mL در روز پنجم، دهم و پانزدهم آزمایش به ترتیب ۳۹/۶۵±۲/۶۴، ۴۵/۹۵±۰/۱۳ و ۴۶/۳۱±۰/۳۷mg/mL محاسبه شد که با وجود سیر صعودی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در طول دوره آزمایش مشاهده نشد. به نظر می‌رسد در این مطالعه، در ماهی حوض اثر تحریکی ۱۷بتا- استرادیول در ساخت ویتلوژنین در دوز مورد استفاده در طی ۵ روز اول به بالاترین میزان خود رسیده و این سطح پلاسمایی ویتلوژنین تا روز ۱۵ حفظ شده است.

بیس فنول A (BPA)، ماده اولیه ساخت پلیمرها، به دلیل استفاده گسترده در صنایع مختلف، همواره در مطالعات سم‌شناسی مورد توجه قرار گرفته است. خاصیت استروژنی BPA به واسطه تقلید عمل هورمون ۱۷بتا- استرادیول درون‌زا در مطالعات آزمایشگاهی و محیطی بسیاری به ثبت رسیده است (Letcher et al., 2005). Huang و همکاران (۲۰۱۲) اثرات استروژنی BPA را در دوزهای ۰/۱ و ۱ng/L در القا ساخت ویتلوژنین در جنس نر *Macrobrachium asperulum* با استفاده از روش ALP نشان دادند. Lv و همکاران (۲۰۰۷) تولید ویتلوژنین در پلاسمای جنس نر ماهی لوچ چینی را در معارضه با غلظت‌های مختلف BPA (۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰µg/L) در طی ۴۲ روز مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند غلظت‌های پایین BPA (۱۰، ۵۰، ۱۰۰µg/L) تا ۲۸ روز پس از معارضه موجب بروز پاسخ‌های قابل تشخیص نشد و ساخت ویتلوژنین از روز ۳۵ شروع و تا روز ۴۲ افزایش یافت. در حالی که غلظت ۵۰۰ µg/L BPA موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۳۱/۹۸±۹/۴۳µg/mL در روز هفتم شد و از روز چهاردهم تا ۴۲ این میزان از ۴/۲۲±۰/۰۲mg/mL به ۴۷/۶۱ mg/mL

1- Red Sea Bream

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش یافت. در قزل‌آلای رنگین‌کمان غلظت پایین‌تر از BPA ۷۰µg/L در آب، در القا ساخت ویتلوژنین تاثیری نداشت در حالی که با افزایش غلظت BPA به میزان ۵۰۰µg/L بعد از ۶ روز موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۱۱۶۸µg/mL شد (Lindholst et al., 2000). همچنین Van den Belt و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که معارضه ماهی گورخری نر و ماهی نابالغ قزل‌آلای رنگین‌کمان با ۱۰۰۰µg/L BPA باعث افزایش سطح پلاسمایی ویتلوژنین در طی سه هفته شد در حالی که غلظت‌های پایین‌تر (۲۰۰µg/L) تاثیری در بروز پاسخ طی سه هفته نداشت. در پژوهش حاضر معارضه ماهی‌ها با غلظت ۵۰۰µg/L BPA موجب ساخت ویتلوژنین به میزان ۶/۳۷±۰/۵، ۷/۰۵±۰/۸ و ۷/۲۲±۱mg/mL در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم شد که با وجود مشاهده روند افزایشی، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در میزان ساخت ویتلوژنین در طول دوره آزمایش مشاهده نشد. دلیل احتمالی این است که با مقایسه نتایج به دست آمده از افراد یک گونه و همچنین بین گونه‌های مختلف، ضمن مد نظر قرار دادن تفاوت‌های گونه‌ای، تفاوت در مرحله تولیدمثلی در بین افراد یک گونه می‌تواند موجب تغییر پاسخ‌ها و تفاوت حساسیت شود و باید مورد توجه قرار بگیرد. دلیل دیگر شاید این باشد که نهایت تاثیر BPA در ۵ روز اول بوده و بعد از آن اثرات مخرب کمتری برای ساخت ویتلوژنین داشته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که BPA در دوز مورد استفاده قادر به القا ساخت ویتلوژنین در جنس نر ماهی حوض بوده بدین معنا که حتی غلظت ناچیز از این ماده‌ی شیمیایی که از اجزای سازنده بسیاری از ترکیبات پلیمری است می‌تواند به عنوان یک آلاینده در طبیعت عمل کرده، سیستم تولید-مثلی ماهیان نر و ماده را تحت تاثیر قرار دهد.

ثابت شده است هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs)، به واسطه داشتن خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی بر فرآیندهایی مانند رشد، تولید مثل و تنظیم اسمزی ماهیان موثر است (Nicolas, 1999) . PAHs به واسطه تقلید کردن و یا از بین بردن اثرات طبیعی هورمون‌ها موجب بروز اختلالاتی در متابولیسم هورمونی و یا فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی تنظیم شونده توسط هورمون می‌شوند و با سیستم نوروآندوکرینی ماهیان رقابت می‌کنند (Navas et al., 2004).

Cooper و Kavlock (۱۹۹۷)، PAHs را به عنوان یکی از موثرترین برهم زننده‌های اندوکرینی معرفی کردند. Pollino و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۰۰۹) اثر غلظت‌های مختلف نفتالن (۱۳۰، ۲۰۰ و۴۰۰ µg/L) را به عنوان یک نوع PAH بر جنس نر و ماده ماهی رنگین‌کمان[1]در طی ۳ و ۱۴ روز مورد مطالعه قرار دادند و تغییراتی در میزان استروئیدهای جنسی بعد از ۳ روز مشاهده نکردند در حالی که کاهش میزان ۱۷بتا- استرادیول در ماده‌ها و افزایش میزان تستسترون در نرها را پس از ۱۴ روز بیان کردند. Thomas و Budiantara (۱۹۹۵) با مطالعه بر Atlantic croaker[2] در شرایط آزمایشگاهی اظهار داشتند نفتالن در غلظت ۱۰ng/mL به واسطه تداخل با رسپتورهای غشایی هورمون‌ها باعث کاهش حساسیت غده هیپوفیز به تحریکات هورمونی می‌شود. Thomas (۱۹۸۹) بر اساس مطالعات آزمایشگاهی نشان داد کاهش غلظت ۱۷بتا- استرادیول در نتیجه کاهش تولید استروئید توسط سلول‌های فولیکولی نیست. در حالی که Anderson و همکاران (۱۹۹۶) اختلال در محور هیپوفیز-گنادی را که منجر به کاهش سطوح پلاسمایی گنادوتروپین‌ها و همچنین بیوسنتز استروئیدها در تخمدان می‌شود، دلیلی بر کاهش میزان ۱۷بتا- استرادیول مطرح کردند. همچنین نشان دادند در غلظت‌های پایین ۱۷بتا- استرادیول معارضه با غلظت کم بتا- نفتوفلاون[3](یکی از ترکیبات PAH؛ ۱۲/۵ mg/Kg) موجب تحریک زرده-سازی در جنس ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان می-شود در حالی که غلظت‌های بالاتر بتا-نفتوفلاون (۲۵-۵۰ mg/Kg) موجب مهار زرده-سازی می‌شود. همچنین در غلظت‌های بالای ۱۷بتا- استرادیول، همه غلظت‌های نفتوفلاون موجب فعال شدن زرده‌سازی شد (Stegeman and Hahn, 1994).

در این مطالعه، در ماهی حوض میزان ویتلوژنین تولید شده در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم آزمایش به ازای ۲۰۰µg/L از نفتالن به ترتیب ۳/۸۲±۰/۵، ۳/۱۶±۰/۴ و ۰/۷±۰/۱mg/mL محاسبه شد که با وجود مشاهده روند نزولی بین روزهای پنجم و دهم آزمایش، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به دلایل مختلف ذکر شده در مورد اثر نفتالن بر میزان هورمون ۱۷بتا-استرادیول و اثر تحریکی نفتالن در گونه مورد مطالعه، به نظر می‌رسد علت افزایش میزان ویتلوژنین در روزهای پنجم و دهم به واسطه اثر نفتالن بر رسپتورهای استروژنی (ER) در سطح

1- Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*)
2- *M. undulatus*
3- β Naphthoflavone

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های کبدی و تقلید عمل ۱۷بتا-استرادیول و نهایتا ساخت ویتلوژنین باشد به طوری که معارضه طولانی مدت ماهی نر با نفتالن موجب فعال شدن سیستم آنزیمی P450 و خاصیت سم‌زدایی ناشی از فعالیت این آنزیم‌ها و در نتیجه متابولیزه کردن نفتالن و از بین بردن اثر تحریکی متابولیت‌های ثانویه حاصل از آن بر رسپتورهای استروژنی شده است. به عبارت دیگر متابولیت‌های ثانویه حاصل از تجزیه نفتالن توسط سیستم آنزیمی P450، ضمن از دست دادن خاصیت استروژنی خود قادر به تاثیر بر گیرنده‌های استروژنی در سطح سلول‌های کبدی و در نتیجه القا ساخت ویتلوژنین نخواهند بود (Snowberger et al., 1991). Pollino و همکاران (۲۰۰۹) اظهار داشتند که اثرات سمی PAHs به فاکتورهایی مانند سطح معارضه، میزان متابولیسم PAHs و شکل متابولیت‌های حاصله که عمدتا سمی‌تر از ترکیبات اولیه خود هستند بستگی دارد. متابولیسم PAHs توسط گروهی از آنزیم‌های سم‌زدا به نام خانواده آنزیمی سیتوکروم P450 صورت می‌گیرد (Snowberger et al., 1991). فعال شدن سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 1A (CYP1A) در اثر معارضه با بنزو آلفا پیرن[1] (یکی از ترکیبات PAHs) و تولید متابولیت‌های ثانویه سمی‌تر توسط Wu و همکاران (۲۰۰۳) مطرح شد. Livingstone (۱۹۹۸) بیان کرد تغییر شکل PAHs به متابولیت‌های ثانویه می‌تواند موجب افزایش ۱۰ تا ۱۰۰ برابری فعالیت CYP1A شود. فعالیت ضداستروژنی سیتوکروم P450 که منجر به کاهش ساخت ویتلوژنین و تشکیل تخم می‌شود توسط Anderson و همکاران (۱۹۹۶) مطرح شد. کاهش سطح سلولی مواد ضروری مورد نیاز برای ساخت ویتلوژنین از جمله کلسیم و فسفات می‌تواند دلیل احتمالی دیگر بر سیر نزولی ساخت ویتلوژنین در معارضه طولانی مدت با نفتالن در ماهی حوض، در این مطالعه، باشد. با توجه به پژوهش‌های محدود صورت گرفته در مورد اثر نفتالن بر جنس نر و ضمن مد نظر قرار دادن تفاوت‌های گونه‌ای، به نظر می‌رسد که نفتالن می‌تواند کاندیدای مناسبی به عنوان یک آلاینده برهم زننده‌ی اندوکرینی باشد با این تفاوت که این اثر برهم زنندگی هم می‌تواند به شکل ساخت ویتلوژنین در معارضه کوتاه مدت و هم جلوگیری از ساخت آن در طولانی مدت در جنس نر باشد. با این حال پژوهش‌های

1- Benzo[α]pyrene

www.SID.ir

Archive of SID

گسترده‌تر در این زمینه می‌تواند پاسخ شفاف-تری به همراه داشته باشد اما آنچه مسلم است خاصیت آلایندگی این ترکیب PAH حتی در غلظت‌های ناچیز در اکوسیستم‌های آبی است.

مواد شیمیایی سنتزی مانند حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها در تکنولوژی مدرن کشاورزی به عنوان یک وسیله دفاعی موثر جهت کنترل آفت‌ها و علف‌های هرز به منظور تولید محصولات غذایی بیش‌تر و با کیفیت‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند. ورود این ترکیبات به اکوسیستم‌های آبی، می‌تواند بر سلامت موجودات آبزی به ویژه ماهیان که مهم‌ترین عضو زنجیره غذایی هستند تاثیرگذار باشد (Faromb et al., 2008; Ndimele et al., 2010). اثرات سوء این ترکیبات تنها محدود به تغییرات فیزیولوژیکی و بقا موجودات آبزی و ماهیان نمی‌شود بلکه آسیب ژنومی و ایجاد جهش و سرطان‌زایی از پیامدهای دیگر مواجهه موجودات آبزی با این ترکیبات به شمار می‌رود (Nwani et al., 2010). بوتاکلر به عنوان یکی از پر مصرف‌ترین علف‌کش‌ها جهت کنترل علف-های هرز مزارع برنج مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lasheidani et al., 2008; Faromb et al., 2008). ثابت شده است بوتاکلر با ساختار شیمیایی مشابه استروژن‌ها، با ورود به اکوسیستم‌های آبی می‌تواند منجر به تغییرات فیزیولوژیکی قابل توجهی در جانداران آبزی شود (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۱). Chang و همکاران (۲۰۱۳) اثرات بوتاکلر را بر سیستم تولیدمثلی و سطوح هورمونی ماهی گورخری مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که بوتاکلر در دوز ۱۰۰µg/L منجر به افزایش میزان ویتلوژنین پلاسما در جنس نر می‌شود. معارضه ماهی سفید نر[1] با غلظت بالای بوتاکلر (۷۵٪ LC_{50}، ۰/۳۲۲ppm) کاهش حجم، تراکم و تعداد اسپرم‌ها و همچنین افزایش تعداد اسپرم-های غیرطبیعی را به دنبال داشت (Lasheidani et al., 2008). Yadav و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه اثرات ژنوتوکسیک[2] بوتاکلر بر ماهی آب شیرین *Cirrhinus mrigala*، افزایش هسته‌های کوچک[3] در اریتروسیت‌ها پس از ۴۸ ساعت و کاهش رشد پس از ۶۰ روز معارضه با غلظت ۱ppm بوتاکلر را گزارش کردند. در مواجهه گربه ماهی آفریقایی با غلظت‌های مختلف بوتاکلر (۱، ۲ و ۲/۵ ppm) به مدت ۲۴ ساعت، بوتاکلر با اثر بر سیستم

1- Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*)
2- Genotoxic
3- Micronuclei

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیمی آنتی‌اکسیدانی، موجب استرس اکسیداتیو در اندام‌های مختلف ماهی شد (Faromb et al., 2008). Wang و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که غلظت‌های پایین بوتاکلر موجود در مزارع موجب اثرات سمی شدید بر *Cyprinus carpio* شد. در پژوهش حاضر مواجهه ماهی حوض با بوتاکلر ٪۶۰ به میزان ۰/۲۸ µL/L منجر به تولید ویتلوژنین به میزان ۲/۶۶±۰/۱۶ mg/mL در روز پنجم و ۳/۲۱±۰/۱۵ mg/mL در روز دهم شد. با وجود مشاهده روند صعودی، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در طول آزمایش مشاهده نشد. با توجه به این که ساختار شیمیایی بوتاکلر مشابه استروژن‌ها است و همچنین ساخت ویتلوژنین در گونه مورد مطالعه، اثر تحریکی بوتاکلر در ساخت ویتلوژنین به واسطه تقلید عمل ۱۷بتا- استرادیول در ساخت ویتلوژنین غیر محتمل به نظر نمی‌رسد. با توجه به مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات سمی بوتاکلر در سطح ژنتیکی، سلولی، بافتی و عملکردهای فیزیولوژیکی، از بین رفتن نمونه‌های مورد مطالعه پس از ۱۰ روز حاکی از وجود اثرات سمی شدید بوتاکلر در اثر معارضه طولانی مدت در گونه مورد نظر است و می‌توان اظهار داشت که اثرات غیراستروژنیک این آلاینده بسیار شدیدتر است به طوری که ساخت ویتلوژنین به واسطه القای بوتاکلر شاید یکی از پیامدهای بی‌اهمیت آن باشد و اثرات سمی این آلاینده حتی منجر به مرگ آبزیان هم خواهد شد.

اثر تزریق برهم زننده‌ها به ماهی‌ها

آزمایش مرحله دوم به منظور بررسی اثرات کوتاه مدت تیمارهای مورد نظر بر ماهی حوض صورت گرفت. در Killifish[1] تزریق درون صفاقی BPA به میزان ۵۰mg/Kg به ازای وزن بدن پس از ۸ روز معارضه منجر به تولید ویتلوژنین به میزان ۰/۱۷ mg/mL شد (Lv et al., 2007). معارضه درون صفاقی جنس ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله پیش‌زرده-سازی[2] و مراحل اولیه زرده‌سازی[3] با نفتالن در غلظت ۵۰mg/Kg به ازای وزن بدن، به مدت ۳ ساعت و ۳ روز، کاهش سطح پلاسمایی هورمون ۱۷بتا- استرادیول را به دنبال داشت (Tintos et al., 2006). در حالی که Pollino و همکاران (۲۰۰۹) با مطالعه اثر غلظت‌های مختلف نفتالن (۱۳۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/L) بر ماهی رنگین‌کمان

1- *Fundulus heteroclitus*
2- Previtellogenic
3- Early Vitellogenic

www.SID.ir

Archive of SID

(*Melanotaenia fluviatilis*) تغییراتی در میزان استروئیدهای جنسی در دو جنس نر و ماده پس از ۳ روز مشاهده نکردند. در پژوهش حاضر، تزریق درون صفاقی BPA و نفتالن با غلظت ۵۰mg/Kg به ازای وزن بدن، پس از ۴۸ ساعت معارضه، منجر به ساخت ویتلوژنین به میزان ۱/۰۴±۰/۱۱ و ۱/۴۸±۰/۲mg/mL شد. با وجود مشاهده اختلاف معنی‌دار بین گروه شاهد و تیمارها، بین دو تیمار BPA و نفتالن از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. لازم به ذکر است که می‌توان دوزهای مورد استفاده را به عنوان LC_{50} ۴۸ ساعته تیمارها در نظر گرفت به طوری که منجر به مرگ ٪۵۰ از نمونه‌ها در مدت ۴۸ ساعت شد. درحالی که نمونه‌های بوتاکلر همگی از بین رفتند. با توجه به نتایج به دست آمده شاید بتوان ساخت ویتلوژنین را دلیلی بر قابلیت تحریک کنندگی بالای تیمارهای مذکور و همچنین حساسیت زیاد گونه مورد نظر نسبت به تیمارها، در طی معارضه کوتاه مدت، دانست.

در مطالعه حاضر، با مقایسه معارضه تزریقی و بلند مدت ترکیبات برهم زننده مذکور در ماهی حوض می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اثرات القایی شدید ساخت ویتلوژنین به واسطه این تیمارها نیاز به پروسه زمانی حداقل بیش از ۴۸ ساعت دارد (به دلیل میزان پایین ویتلوژنین القا شده) و اثر مستقیم تیمارها با دوزهای بالا از طریق تزریق حتی می‌تواند مرگ را هم به دنبال داشته باشد که نشان دهنده اثرات مخرب غیراستروژنیک این تیمارها است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

اسماعیلی ساری ع. ۱۳۸۱. آلاینده ها, بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر، چاپ اول، ۷۶۷ص.

Anderson M., Miller M. and Hinton D. 1996. In vitro modulation of 17-beta-estradiol induced vitellogenin synthesis: effects of cytochrome P4501 A1 inducing compounds in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. Aquatic Toxicology, 34: 327–350.

Bieberstein U., Berbner T., Islinger M. and Braunbeck T. 1999. Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes during immunofluorescence. Science of the Total Environment, 233: 67–75.

Chang J., Liu S., Zhou S., Wang M. and Zhu G. 2013. Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). Experimental and Toxicologic Pathology, 65(1-2): 205–209.

Cooper R.L. and Kavlock R.J. 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: A weight-of-evidence overview. Journal of Endocrinology, 152: 159–166.

Di Giulio R.T. and Hinton D.E. 2008. The toxicology of fishes, CRC Press. 1096 P.

Faromb E.O., Ajimoko Y.R. and Adelowo O.A. 2008. Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African catfish, (*Clarias gariepinus*). International Journal of Environmental Research and Public Health, 5(5): 423–427.

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, 89: 1023–1042.

Hara A. and Hirai H. 1976. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Biochimica et Biophysica Acta, 437: 549–557.

Hiramatsu N., Matsubara T., Fujita T., Sullivan C.V. and Hara A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. Marine Biology, 149: 35–47.

www.SID.ir

Archive of SID

Huang K.H., Chiu Y.W., Wang S.Y., Chen H.C. and Huang D.J. 2012. Evaluation of the estrogenic effects of Bisphenol-A on male freshwater prawn *Macrobrachium asperulum*. Journal of Environmental Biology, 33: 805–810.

Hutchinson T.H., Ankley G.T., Segner H. and Tyler C.R. 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as Signposts Not Traffic lights in risk assessment. Environmental Health Perspectives, 114: 106–114.

Lasheidani M.F., Balouchi S.N., Keyvan A., Jamili S. and Falakrou K. 2008. Effects of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901). Research Journal of Environmental Sciences, 2(6): 474–482.

Letcher R.J., Sanderson J.T., Bokkers A., Giesy J.P. and Van den Berg M., 2005. Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. Taxicology and Applied Pharmacology, 209: 95–104.

Lindholst C., Pederson K.L. and Pederson S.N. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 48: 87–94.

Livingstone D. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quatitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology A, 120: 43–49.

LV X., Zhou Q., Song M., Jiang G. and Shao J. 2007. Vitellogenic responses of 17β-estradiol and bisphenol A in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 24: 155–159.

Navas J.M., Zanuy S., Segner H. and Carrillo M. 2004. β-Naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17β-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. Aquatic Toxicology, 67: 337–345.

Ndimele P.E., Jenyo-Oni A. and Jiburke C.C. 2010. Comparative toxicity of crude oil, dispersant and crude oil- plus- dispersant to *Tilapia guineensis*. Research Journal of Environmental Toxicology, 4: 13–22.

Nicolas J.M. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Aquatic Toxicology, 45: 77–90.

Nwani C.D., Lakra W.S., Nagpure N.S., Kumar R., Kushwaha B. and Srivastava S.K. 2010. Mutagenic and genotoxic effects of

www.SID.ir

Archive of SID

carbosulphan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. Food and Chemical Toxicology, 48: 202–208.

Pan M.J., Bell W.J. and Telfer W.H. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. Science, 165: 393–394.

Patino R. and Sullivan C.V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry, 26: 57–70.

Pollino C.A., Georgiades E. and Holdway D.A. 2009. Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72: 1265–1270.

Rocha M.J., Arukwe A. and Kapoor B.G. 2008. Fish reproduction. Science Publishers. 655P.

Shao J., Shi G., Song M. and Jiang G. 2007. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for vitellogenin in Chinese loach (*Misgurnus angaillicaudatus*). Environment International, 31: 763–770.

Snowberger G.E., Woodin B.R. and Stegeman J.J. 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. Journal of Experimental Zoology, 259: 230–342.

Stegeman J.J. and Hahn M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. P: 87–206. In: Malins D.C. and Ostrander G.K. (Eds.). Aquatic Toxicology and Cellular Perspectives, CRC Press, Boca Raton, FL.

Stifani S., Le Menn F., Rodriguez J.N. and Schneider W.J. 1990. Regulation of oogenesis: The piscine receptor for vitellogenin. Biochimica et Biophysica Acta, 1045: 271–279.

Sun B., Pankhurst N.W. and Watts M. 2003. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin measurement in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. Fish Physiology and Biochemistry, 29: 13–21.

Thomas P. 1989. Effects of Aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in Atlantic croaker. Marine Environmental Research, 28: 499–503.

www.SID.ir

Archive of SID

Thomas P. and Budiantara L. 1995. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker. Marine Environmental Research, 39: 147–150.

Tintos A., Gesto M., Miguez J.M. and Soengas J.L. 2006. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 66: 139–147.

Tyler C.R., Van der Eerden B., Jobling S., Panter G. and Sumpter J.P. 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. Journal of Comparative Physiology B, 166: 418–426.

Van den Belt K., Verheyen R. and Witters H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental strogens. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 271–281.

Wang S., Cheng C.C., Liu H. and Chiangh C., 1991. Residue of three herbicides in paddy water and their danger level to carp. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 29(2): 195–202.

Wang Y.S., Jaw C.G., Tang H.C., Lin T.S. and Chen Y.L. 1992. Accumulation and release of herbicides Butachlor, Thiobencarb, and Chlomethoxyfen by fish, clam, and shrimp. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 48(3): 474–480.

Watts M., Pankhurst N.W., Pryce A. and Sun B. 2003. Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. Comparative Biochemistry and Physiology B, 134: 467–476.

Weltzien FA., Andersson Q., Tabrizi K.S. and Norberg B. 2004. The brain pituitary gonad axis in male teleosts, with apecial emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). Comparative Biochemistry and Physiology, 137: 447– 477.

Wu R.S.S., Pollino C.A., Au D.W.T., Zheng G.J., Yuen B.B.H. and Lam P.K.S. 2003. Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) upon foodborne exposure to benzo[a]pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 1568–1573.

Yadav A.S., Bhathagar A. and Kaur M. 2010. Assessment of genotoxic effects of butachlor in fresh water fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Research Journal of

www.SID.ir

Archive of SID

Environmental Toxicology, 4(4): 223–230.

Yamanaka S.H., Arizono K., Matsuda Y., Soyano K., Urushitani H., Iguchi T. and Sakakibara R. 1998. Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62(6): 1196–1200.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 2, Summer 2015

Study of plasma vitellogenin induced by endocrine disrupters as a water pollution biomarker in the male goldfish

Elham Abdzadeh[1], Behrooz Heidari[2]*, Reza Hassan Sajedi[3]

Received: May 2015 Accepted: July 2015

Abstract

The goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a freshwater species that is one of the earliest fish to be domesticated, and is one of the most common aquarium fish. To study plasma levels of induced vitellogenin by endocrine disrupting chemicals (EDCs), 17β-estradiol, Bisphenol A, Naphthalene and Butachlor were used. This study was conducted in two separate parts. First, Bisphenol A, Naphthalene and Butachlor were added to aquariums containing goldfish with doses of 500µg/L, 200µg/L and 0.28µg/L, respectively, for 15 days. Then blood sampling was performed on days 5, 10 and 15 of the experiment. Second, 17β-estradiol, Bisphenol A, Naphthalene and Butachlor were injected directly to the fishes with doses of 0.5mg/mL, 50mg/Kg, 50mg/Kg, 20µL and blood sampling was performed after 48h. After separating plasma, phosphate and vitellogenin amounts of each treatment were measured and calculated by using of ALP test. Results from the first experiment showed that there was significant difference between vitellogenin content of treatments and control ($P<0.05$). The highest level of vitellogenin was devoted to 17β-estradiol and Bisphenol A, respectively. There was no statistically significant difference between Naphthalene and Butachlor treatments. Results from the second experiment showed that there was significant difference between control and treatments ($P<0.05$), while there was no significant difference between Bisphenol A and Naphthalene treatments ($P>0.05$). According to the results, in this study, Bisphenol A, Naphthalene and Butachlor can be considered as EDC in both experiments by inducing of vitellogenin synthesis.

Key words: *17β-estradiol, Bisphenol A, Naphthalene, Butachlor, ALP, EDC.*

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran **and** Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Associated Professor in Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tehran, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
*Corresponding Author: bheidari@guilan.ac.ir

www.SID.ir