بررسی اثر ۴- نونیل فنل برسطوح پلاسمائی تولید ویتلوژنین و تغییرات هورمون‌های استروئیدی در ماهی نابالغ کپور کوی (*Cyprinus carpio carpio*)

- **همایون حسین‌زاده*:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ١٤١٥٥٦١١٦
- **پریسا امانی‌نژاد:** گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ١٤٧٧٨٩٣٨٥٥
- **مهدی سلطانی:** گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران، صندوق پستی: ١٤١٩٩٦٣١١١

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

تاثیر ماده شبه استروژنی ٤-نونیل فنل بر تولید ویتلوژنین و تغییرات هورمون‌های استروئیدی (۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون و پروژسترون) در پلاسمای خون ماهیان نابالغ نر و ماده کپورکوی بررسی شد. بدین منظور ماهیان درخلال سه هفته به‌صورت تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم ٤-نونیل فنل و ۲میکروگرم ۱۷-بتااسترادیول به‌ازای هر گرم وزن بدن دریافت نمودند. از ماهیان در روزهای ۰ و ۲۲ نمونه‌برداری به‌عمل آمد. غلظت هورمون‌های جنسی در پلاسما به‌روش رادیوایمونواسی وسطوح ویتلوژنین پلاسما به‌روش الایزا اندازه‌گیری‌شد. نتایج این بررسی‌نشان داد‌که میزان ویتلوژنین و هورمون ۱۷ بتا استرادیول درغلظت ۵۰ میکروگرم ٤-نونیل فنل (۳/۲۱±۵۱/٦٦) و ۲ میکروگرم ۱۷-بتا استرادیول (٦/۰۲±۵۸) در جنس نر و ماده افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). اما میزان تغییرات ویتلوژنین و ۱۷-بتا استرادیول در غلظت ۱۰۰ میکروگرم نونیل فنل کاهش معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم از خود نشان داد (p<۰/۰۵). در مورد پروژسترون در تمامی گروه‌هایی که با نونیل فنل تیمار شده بودند، تاثیرمعنی‌داری دیده نشد و تنها در غلظت ۲ میکروگرم ۱۷-بتا استرادیول کاهش معنی‌داری دیده شد. هم‌چنین میزان تستوسترون نیز به‌جز در تیمار ۲ میکروگرم ۱۷-بتا استرادیول اختلاف معنی‌داری در گروه‌های تیمار شده نداشت (p>۰/۰۵). این نتایج بیانگر اثرات مخرب ٤-نونیل فنل با استفاده از نشانگرهای هورمونی و ارزیابی میزان حساسیت ماهی کپور کوی نابالغ در برابر این ترکیبات می باشد .

کلمات کلیدی: ویتلوژنین، هورمون‌های استروئیدی، ۴-نونیل فنل، کپور کوی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: H_Hosseinzadeh@yahoo.com

مقدمه

با افزایش جمعیت و پیشرفت تکنولوژی،(EDCs)به‌طور گسترده در طبیعت، به‌ویژه در اکوسیستم‌های آبی وارد شده‌اند. این در حالی است که بسیاری از آن‌ها در محیط‌زیست، پایدار و غیرقابل تجزیه می‌باشند(Pait و Nelson، ۲۰۰۳).این‌مواد‌که به‌طور طبیعی و مصنوعی ساخته می‌شوند، اکثراً در بدن موجوداتی که در معرض آلودگی هستند، شبیه هورمون‌های استروژنی عمل می‌کنند، به‌همین دلیل نام آن‌ها ترکیبات شبه استروژنی می‌باشد. در این میان نونیل فنل از مشتقات آلکیل فنل‌ها می‌باشند که با توجه به عملکرد شبه‌استروژنی خود در گروه ترکیبات مصنوعی استروژنی غیراستروئیدی جای دارند، و جزء ترکیبات زنوبیوتیک می‌باشند. آلکیل فنل‌ها ترکیباتی فنل می‌باشند که از اتصال یک یا تعداد بیش‌تر زنجیره آلکیلی به یک حلقه آروماتیک تشکیل می‌شوند (Lee و Lee، ۱۹۹۶). این ترکیبات از واسطه‌هایی در پالایش نفت و قطران ذغال‌سنگ به‌وجود می‌آیند (Yang و همکاران، ۲۰۰۸). نونیل فنل (NP) یکی از اعضای خانواده آلکیل فنل‌ها بوده که به‌طور گسترده‌ای در ساخت فسفیت‌های نونیل فنل، اسپری‌های حشره‌کش و نونیل فنل اتوکسیلات (Nonylphenol ethoxylates) به‌کار می‌رود (McCormick و همکاران، ۲۰۰۵). نونیل فنل اتوکسیلات‌ها یک گروه بزرگ از سورفاکتانت‌های غیریونی می‌باشند که در تولید روغن موتورها، امولسیون‌کننده‌ها، پلاستیک‌ها، رنگ‌های لاتکس، دترجنت‌های خانگی و صنعتی، حلال‌ها و صنایع کاغذ و منسوجات به کار گرفته می‌شوند (Snyder و همکاران، ۲۰۰۱؛ Maguire، ۱۹۹۹). نونیل فنل همانند سایر آلکیل فنل‌ها در محیط مقاوم بوده، بسیارچربی دوست می‌باشد و متعاقباً می‌تواند منجر به تجمع زیستی در موجودات آبزی گردد (Ahel، ۱۹۹۴). به‌دلیل شباهت ساختاری با ۱۷-بتااسترادیول (E2)، نونیل فنل اثر این هورمون طبیعی را به‌وسیلهٔ رقابت برای اتصال به گیرنده‌های استروژن کبدی تقلید کرده و از این‌رو قادر است عملکرد طبیعی سیستم آندوکرینی را تحت تأثیر قرار دهد. به‌علاوه از میان ایزومرهای نونیل فنل، آستانه خطر سازی پارانونیل فنل (۴- نونیل فنل) در بیش‌ترین سطح قرار دارد (۵ میکروگرم در لیتر) (Lee و Lee، ۱۹۹۶). علاوه بر این نونیل فنل و نونیل فنل اتوکسیلات قادر به ایجاد تغییرات در ساختار بیضه‌ای و تحریک سنتز ویتلوژنین در ماهیان، هم در شرایط محیطی و هم در شرایط آزمایشگاهی بوده‌اند(Korsgaard و همکاران، ۱۹۸۳). ویتلوژنین یک گلیکولیپوپروتئین بزرگ سرم بوده که به‌صورت طبیعی توسط جنس ماده مهره‌داران تخم‌گذار در پاسخ به استروژن‌های درونی در کبد تولید شده، به‌درون خون آزاد گشته و در اووسیت‌های در حال رشد ذخیره می‌گردد (Heppell و همکاران، ۱۹۹۵). ویتلوژنین پیش ماده پروتئین زرده تخمک، در پاسخ به تولید ۱۷- بتا استرادیول ترشح شده از لایه فولیکولی تخمدان در کبد تولید می‌شود (Sa و همکاران، ۲۰۰۶). به‌صورت طبیعی این پروتئین‌ها فقط در سرم جانور ماده دیده می‌شود، ولی جانور نر و نابالغ هم‌زمانی‌که با استروژن‌های خارجی و یا شبه‌استروژنی مواجهه می‌شوند پروتئین‌ها را سنتز می‌کنند (Hiramatsu و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از بیش‌ترین مسیرهایی که توسط EDCsها تأثیر می‌پذیرد، محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد است. آزادشدن هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) از هیپوتالاموس در پاسخ به عوامل محیطی در ماهی منجر به تولید و آزاد شدن هورمون گنادوتروپین (GTH) از غده هیپوفیز می‌شود. گنادوتروپین آزاد شده به سیستم گردش خون منجر به افزایش آندروژن و استروژن توسط گنادها می‌شود. بیش‌ترین استروژن در ماهی ماده ۱۷-بتا استرادیول (E2) است که ابتدا در تخمدان توسط سلول‌های فولیکولی تولید می‌شود (Soto و همکاران، ۱۹۹۷). در عین حال استروئیدهای تولیدشده در تخمدان و بیضه می‌توانند اثرات تنظیم افزایشی یا تنظیم کاهشی خود را براساس نیاز فیزیولوژیکی ماهی در سطح هیپوتالاموس اعمال نمایند(Archand و Benson، ۱۹۹۸). در حال حاضر اخلال گرهای هورمونی زنواستروژن می‌توانند در ایجاد اختلالات تولیدمثلی نقش داشته باشند (Colborn و همکاران، ۱۹۹۳). زنواستروژن‌ها می‌توانند از تعدادی از استروژن‌ها تقلید کرده و اثراتی نظیر تحریک سنتز ویتلوژنین را در هر دو جنس نر و ماده القا نمایند. از این‌رو محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ گناد را از طریق اعمال بازخورد تحت تأثیر قرار داده و به این ترتیب محور تولیدمثلی را دچار اختلال می‌نماید. طبق مطالعات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی نونیل فنل اثرات مخرب هورمونی برروی ماهی داشته و خواص استروژنیک آن به اثبات رسیده است(Coldham و همکاران، ۱۹۹۸؛ Jobling و همکاران، ۱۹۹۶) به‌طوری‌که Leroy و همکاران (۱۹۹۶) در تحقیقی نشان دادند که نونیل فنل دارای اثرات کاهش دهنده بر میزان هورمون تستوسترون در ماهی کپور رودخانه‌ای در امریکا است(Archand و Benso، ۱۹۹۸). هم‌چنین اثرات استروژنیک این ترکیب در ماهی نر به‌صورت القای تولیدویتلوژنین در کبد است (Verslyke و همکاران، ۲۰۰۲؛ Jobling و Sumpter، ۱۹۹۳). Martin Skiltan و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی اثر نونیل فنل با غلظت۳۰ میگروگرم در لیتر را بر روی ماهی

(*Scophthalmus maximus turbot*) نابالغ و روغن ماهی نابالغ (*Gadus morhua*) مورد بررسی قرار دادند، که مواجهه با نونیل فنل باعث کاهش معنی‌داری در سطح هورمون‌های استرادیول و تستوسترون در پلاسما و هم‌چنین کاهش آنزیم آروماتاز در تخمدان و کاهش میزان گلوکورونیداسیون استروئیدهای جنسی در ماهی Turbot شد (Martin Skiltan و همکاران، ۲۰۰۶).

کپور کوی گروه بزرگی از ماهیان را تشکیل می‌دهد که در اصل متعلق به اروپای مرکزی و آسیا می‌باشند. گونه‌های مختلف کپور که در اصل اهلی شده‌اند در شرق آسیا، جائی که از آن‌ها به‌عنوان غذای ماهی استفاده می‌شود یافت می‌شوند. این ماهی قادر به زندگی در آب شیرین و محیط‌های دریائی بوده و ارزش تجاری بالا، سازگاری آسان با اسارت و در دسترس بودن تکنولوژی تکثیر و پرورش آن موجب شده که در سال‌های اخیر پرورش این ماهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار گردد (Schmidt و همکاران، ۲۰۰۵). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استروژنیک ۴-نونیل فنل بر سنتز ویتلوژنین و تغییرات هورمون‌های استروئیدی در ماهی کپور کوی 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 سال ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی کپور کوی نابالغ نر و ماده (*Cyprinus carpio carpio*) با میانگین وزنی (۵۰±۱۰گرم) از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سازمان فنی و حرفه‌ای استان تهران تهیه شدند. ماهیان به‌صورت تصادفی در ۱۸ آکوآریوم ۲۰ لیتری (۱۰ ماهی در هر آکوآریوم) رهاسازی شدند. جهت سازگاری ماهی‌ها به‌مدت ۱۰ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آب روزانه به‌میزان ۸۰ درصد تعویض و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ۱۰-۵ ppt و PH=۶/۸) اندازه‌گیری شد. در کل دورهٔ آزمایش هیچ‌گونه غذادهی صورت نگرفت.

تزریق ماهیان: به‌منظور مواجهه ماهی کپور کوی با ۴-نونیل فنل، از روش تزریق استفاده شد. بدین منظور پس از بی‌هوش کردن با ۲-فنوکسی اتانول ۰/۱٪ (Merc, Germany)، ماهیان ۳ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن از ۴- نونیل فنل (Schenectady, NY, USA) با درجه خلوص ۹۵/۳٪ در خلال ۳ هفته و به‌صورت تزریق درون صفاقی تحت تزریق قرار گرفتند. هم‌چنین ماهیان ۱ تیمار دوز ۲ میکروگرم بر گرم وزن بدن از ۱۷-بتا استرادیول (Sigma, USA) را به‌عنوان زنواستروژن دریافت کردند. علت استفاده از ۱۷-بتا استرادیول در این مطالعه آزمون فرضیه اثر استروژنیک نونیل فنل بود. تزریق‌ها به‌میزان نصف دوز و یک‌بار در هفته انجام پذیرفت. گروه شاهد حلال تنها میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از حلال (روغن نارگیل+ اتانول) را دریافت کردند، درحالی‌که بر روی ماهیان گروه شاهد هیچ‌گونه 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 هپارین خونگیری شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور g ×۳۰۰۰ سانتریفیوژ گشته و پلاسما به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

سنجش ویتلوژنین کل پلاسما (VG): سطوح ویتلوژنین پلاسما با استفاده از کیت الایزا اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت است که پس از جمع‌آوری نمونه‌های خونی با تیوب میکروکاپیلاری، هپارینه شده و سطح آن اندازه‌گیری شد. سپس سرم خون به بافر ۲۵۰ میکرو لیتری منتقل شده و نمونه‌های رسوب داده شده به سرعت سانتریفیوژ (۸۰۰۰/گرم /۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند و سطوح ویتلوژنین در حدود ۱ هفته اندازه‌گیری شد. اطلاعات ویتلوژنین کل پلاسما به‌طور طبیعی به‌وسیله انتقال لگاریتمی ثبت شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۱).

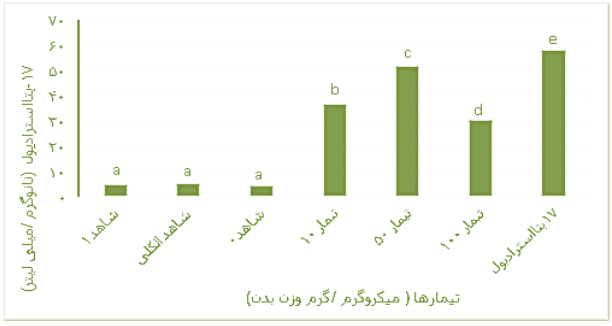
سنجش هورمون‌های استروئیدی: غلظت هورمون‌های جنسی (تستوسترون، ۱۷-بتااسترادیول و پروژسترون) در پلاسما به‌روش رادیو ایمونواسی (RIA) با استفاده از کیت تجاری ImmunoTech (^{125}I RIA kit، فرانسه) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی براساس نانوگرم برلیتر و براساس واکنش رقابتی بین هورمون موجود در سرم با هورمون نشان‌دار شده با ید رادیواکتیو ۱۲۵، جهت اتصال به آنتی‌بادی ضد هورمون در فاز جامد صورت گرفت. پرتودهی حاصل از این اتصال با گاماکانتر LKB ساخت فنلاند اندازه‌گیری شد (Ottobre و همکاران، ۱۹۸۹).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده گردید. تمامی مقادیر به‌صورت میانگین±خطای استاندارد گزارش شده است. ابتدا همگن بودن گروه‌ها با آزمون Levene مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با توجه به همگن بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین تیمارهای آزمایشی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و برای جداسازی

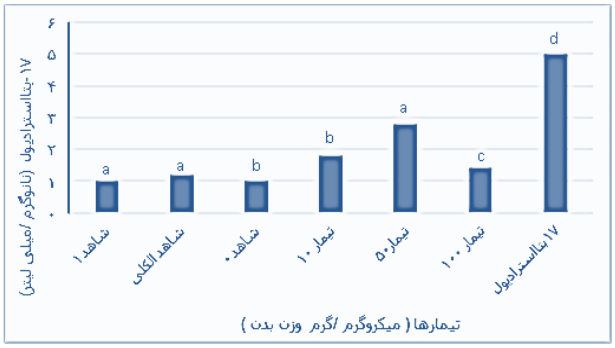
گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد (Zar، ۱۹۹۹).

نتایج

در طول دورهٔ آزمایش هیچ‌گونه تلفاتی در ماهیان مشاهده نشد. نتایج حاصل از پژوهش در مورد اثرات ماده ۴-نونیل فنل بر هورمون‌های جنسی (۱۷-بتااسترادیول، تستوسترون و پروژسترون) در پلاسمای خون ماهی کپور کوی برحسب نانوگرم در میلی‌لیتر پلاسما مورد بررسی قرار گرفت، سطح استرادیول در جنس ماده در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم برگرم افزایش یافت، ولی اوج افزایش آن در تیمار ۵۰ میکروگرم (۶۶/۲۱±۵۱/۳) مشاهده شد (P<۰/۰۵). مقدار استرادیول در جنس ماده در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی‌داری (۳۳/۵۲±۳۰/۱) در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۱). هم‌چنین در جنس نر نیز در غلظت ۵۰ میکروگرم بر گرم افزایش معنی‌دار (۸/۰۸±۲/۰) و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم کاهش معنی‌داری (۴/۵±۱/۰) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۲). سطح استرادیول در غلظت ۲ میکروگرم ۱۷-بتا استرادیول افزایش معنی‌داری (۵۸/۰۲±۶) در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه شاهد از خود نشان داد (P<۰/۰۵). میزان هورمون تستوسترون در جنس ماده در غلظت ۱۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل افزایش معنی‌داری (۴۸/۰۲±۰/۰) در مقایسه با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برگرم از خود نشان داد (P<۰/۰۵) و میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول در تیمار ۲ میکروگرم بر گرم ۱۷-بتا استرادیول افزایش معنی‌داری (۵/۶±۲/۰) در مقایسه با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵)(شکل ۳). میزان هورمون تستوسترون در جنس نر و تمامی تیمارهای نونیل فنل روند یکسانی داشت و اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد دیده نشد (P>۰/۰۵). اما میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول در غلظت ۲ میکروگرم برگرم ۱۷-بتا استرادیول افزایش معنی‌داری (۵/۴±۰) از خود نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۴). میزان هورمون پروژسترون نیز در جنس ماده در تمامی غلظت‌های نونیل‌فنل روند یکسانی داشته و اختلاف آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول در غلظت ۲ میکروگرم بر گرم ۱۷-بتااسترادیول کاهش معنی‌داری (۱۵/۰۲±۰/۰) درمقایسه با گروه شاهد و تیمارهای نونیل‌فنل از خود نشان داد (P<۰/۰۵)(شکل ۵). اثر استروژنیک ۴-نونیل فنل به‌وسیله تحریک سنتز پیش‌ماده پروتئین‌های زرده ویتلوژنین در جنس نر و ماده نابالغ ماهی کپور کوی مشخص شد. سطح ویتلوژنین پلاسما در جنس ماده در یک رفتار وابسته به دوز پس از تزریق شروع به افزایش کرد، به‌طوری‌که در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم افزایش معنی‌داری دیده شد (P<۰/۰۵). اما بیش‌ترین افزایش مربوط به غلظت ۵۰ میکروگرم برگرم (۵۸±۱) بود (P<۰/۰۵).افزایش مشابهی نیز در سطح ویتلوژنین پلاسما در ماهیان تیمار شده با غلظت ۲ میکروگرم بر گرم از ۱۷-بتا استرادیول (۴۵±۴) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). اما میزان ویتلوژنین پلاسما در بالاترین غلظت نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی‌داری (۳۷±۲) در مقایسه با تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل از خود نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۶).

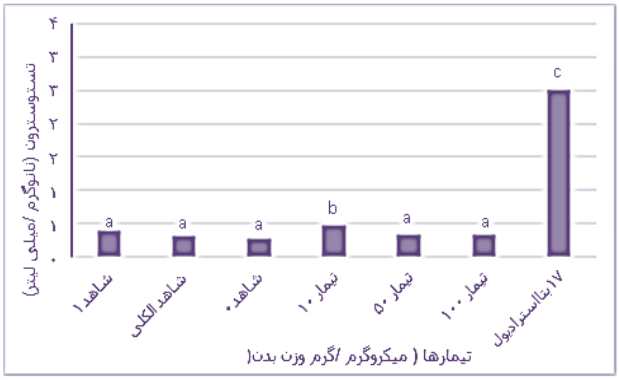


شکل ۱: نمودار غلظت استرادیول پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس ماده کپورکوی(n=۱۰)

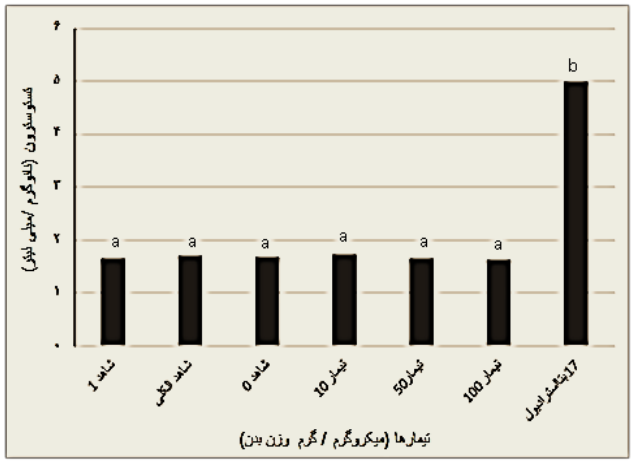


شکل ۲: نمودارغلظت استرادیول پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس نر ماهی کپورکوی(n=۱۰)

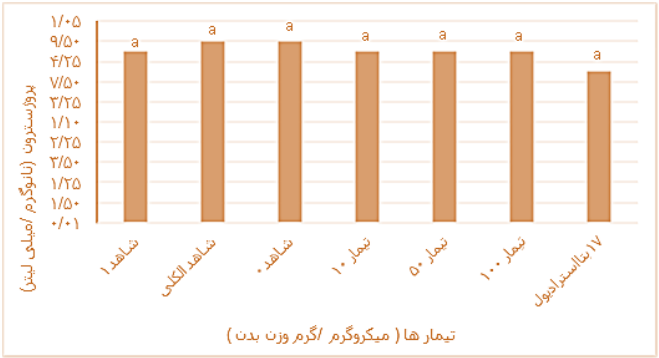
حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۳: نمودار غلظت تستوسترون پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس ماده ماهی کپورکوی(n=۱۰)

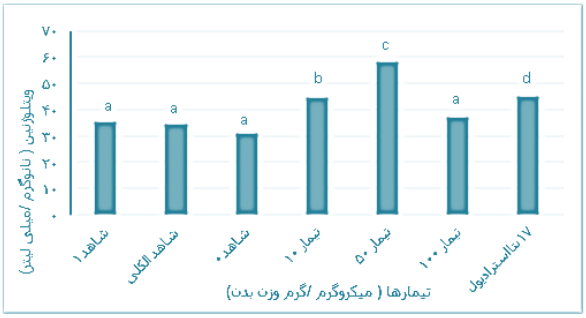


شکل ۴: نمودار غلظت تستوسترون پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس نر ماهی کپورکوی(n=۱۰)



شکل ۵: نمودار غلظت پروژسترون پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس ماده ماهی کپورکوی(n=۱۰)

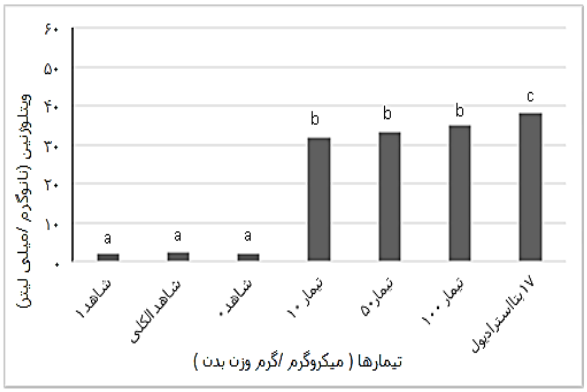
حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۶: نمودار غلظت ویتلوژنین پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس ماده ماهی کپورکوی(n=۱۰)

حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

میزان ویتلوژنین پلاسما در جنس نر در تمامی غلظت‌های نونیل فنل افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین میزان ویتلوژنین در تیمار ۲ میکروگرم بر گرم ۱۷-بتا استرادیول افزایش معنی‌داری (۲±۳۸) در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۷).



شکل ۷: نمودار غلظت ویتلوژنین پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل در جنس نر ماهی کپورکوی(n=۱۰)

حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

بحث

در مطالعه حاضر اثر استروژنیک ماده آلکیل فنلی ۴-نونیل فنل، بر روی ساخت ویتلوژنین و تغییرات هورمون‌های استروئیدی (۱۷-بتا استرادیول- تستوسترون و پروژسترون) در جنس نر و ماده نابالغ ماهی کپورکوی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی سطح ویتلوژنین

پلاسمادر جنس نر و ماده کپور کوی نابالغ در غلظت متوسط ۴-نونیل فنل (۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) افزایش معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های (۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم برگرم وزن بدن) و گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). با این‌حال در بالاترین غلظت نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم برگرم وزن بدن) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد دیده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین در تیمار ۲ میکروگرم بر گرم ۱۷-بتا استرادیول افزایش معنی داری در میزان ویتلوژنین در جنس نر و ماده دیده شد (P<۰/۰۵). درحقیقت ویتلوژنین به‌عنوان تنهاپروتئین حاوی فسفات در خون بسیاری از ماهی‌ها دیده می‌شود. ویتلوژنین یک لیپوفسفو پروتئین غنی از کلسیم می‌باشد، از این‌رو در زمان سنتز آن مقادیر زیادی از کلسیم به‌درون پروتئین انتقال می‌یابد (Gillespieو Peyster، ۲۰۰۴). این کلسیم‌های باندشده به ویتلوژنین در جهت افزایش حلالیت این پروتئین بزرگ در خون می‌باشند (Follett و Redshaw، ۱۹۷۴). Christiancen و همکاران (۱۹۹۸) در طی ۲۵روز با بررسی تأثیر ۴-نونیل فنل در دوزهای پایین و بالا (۱۰و۱۰۰ میکروگرم بر گرم) بر روی (*Zoarces viviparous*) نشان دادندکه نونیل فنل با تقلید اثر ۱۷-بتا استرادیول همانند یک استروژن عمل کرده و موجب سنتز ویتلوژنین می‌گردد (Christiancen و همکاران، ۱۹۹۸).

در بررسی حاضر نیز سطوح ویتلوژنین به‌طور معنی‌داری در تمامی گروه‌های تیمار شده با ۴-نونیل فنل (به‌استثنای دوز ۱۰۰ میکروگرم بر گرم) افزایش یافت (شکل ۶ و ۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دوز ۵۰ میکروگرم برگرم نسبت به تیمار ۱۰ میکروگرم بر گرم ۴-نونیل فنل توانایی بیش‌تری در تحریک سنتز ویتلوژنین دارد. این موضوع اشاره دارد که نونیل فنل در یک رفتار وابسته به دوز موجب تحریک سنتز ویتلوژنین می‌شود، به‌طوری‌که در چندین مورد برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) گزارش شده بود (Kinnberg و همکاران، ۲۰۰۰؛ Jobling و Sumpter، ۱۹۹۳). اما نتایج مطالعهٔ حاضر نیز نشان دادکه دوز ۱۰۰ میکروگرم بر گرم نسبت به سایر تیمارهای ۴-نونیل فنل دارای میزان کم‌تری از ویتلوژنین می‌باشد. این موضوع می‌تواند به‌علت افزایش تراکم گیرنده استروژنی بر روی هپاتوسیت باشد. در مطالعه‌ای که توسط Flouriot و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد، نونیل‌فنل موجب افزایش تراکم گیرنده استروژنی و mRNA ویتلوژنین در کشت سلولی هپاتوسیت‌های قزل‌آلای رنگین کمان‌شود (Flouriot و همکاران، ۱۹۹۵). از این‌رو این ترکیب از طریق اتصال به گیرنده استروژنی در یک مسیر رقابتی اما با توانایی بسیار کم‌تر (۱۰۰۰مرتبه) از ۱۷-بتااسترادیول منجر به‌ایجاد اثر استروژنیک می‌گردد (Flouriot و همکاران، ۱۹۹۵). در مطالعهٔ دیگری که توسط Pait و Nelson (۲۰۰۳) بر روی جنس نر (*Fundulus heteroclitus*) انجام شد، نتایج نشان داد که نونیل فنل مستقیماً و از طریق اتصال به گیرنده‌های استروژنی موجب سنتز ویتلوژنین در کشت سلول‌های کبدی ماهیان می‌شود (Paitو Nelson، ۲۰۰۳). علاوه بر آن در تحقیقی که توسط Snyder و همکاران (۲۰۰۱) بر روی ماهی قنات سر چرب (*Pimephales promelas*) انجام شد، نتایج نشان داد که تجمع زیستی نونیل‌فنل موجب سنتز ویتلوژنین درکشت سلولی هپاتوسیت‌های این ماهی می‌شود (Snyder و همکاران، ۲۰۰۱). تحقیقات اخیر نشان می‌دهدکه نونیل فنل از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم‌منجر به اثرات استروژنیک می‌گردد. به گونه‌ای که در ماهی قنات سرچرب (*P. promelas*) تیمار نونیل فنل به‌جای اثر مستقیم، به‌وسیلهٔ افزایش سطوح ۱۷-بتا استرادیول پلاسما منجر به افزایش تولید ویتلوژنین می‌شود (Giesyو همکاران، ۲۰۰۰). در بررسی دیگری که توسط Meucci و Arukwe (۲۰۰۵) بر روی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) انجام شد، نتایج نشان داد که تزریق ۱۷-بتا استرادیول (۲ میکروگرم بر گرم) و ۴-نونیل فنل (۱۵۰ میکروگرم بر گرم) پس از ۱۴ روز منجر به افزایش هم‌زمان کلسیم کل پلاسما و ویتلوژنین شد که به‌طور آشکاری سنتز کبدی ویتلوژنین را نشان می‌داد (Meucci و Arukwe، ۲۰۰۵). Verslycke و همکاران (۲۰۰۲) هم به‌طور مشابهی یک افزایش معنی‌داری را در سطوح کلسیم، ALP و پروتئین کل پلاسمای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) که با دوزهای مختلف از ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول (۱۷-α-Ethinyl estradiol) تزریق شده بودند را در مقایسه با ماهیان گروه شاهد نشان دادند (Verslyke و همکاران، ۲۰۰۲). در بررسی دیگری که توسط Schwaiger و همکاران (۲۰۰۲) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، نتایج نشان داد که غلظت ویتلوژنین در پلاسمای مولدین نر نیز در اثر مواجهه با نونیل فنل افزایش یافت (Schwaigerوهمکاران، ۲۰۰۲). هم‌چنین در تحقیقی مواجهه ماهی (*Gobio cyprisrare minnow*) بالغ به‌مدت ۲۸ روز با غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل باعث افزایش شاخص گنادوسوماتیک در جنس نر و نیز القاء ویتلوژنین در پلاسمای جنس نر شد (Zha و همکاران، ۲۰۰۷). به‌عنوان یک نتیجهٔ کلی القاء شدن سنتز ویتلوژنین با افزایش متابولیسم کبد منجر به بزرگ شدن اندازهٔ آن و متعاقباً افزایش شاخص هپاتوسوماتیک می‌گردد (Korte و همکاران، ۲۰۰۰). از این‌رو به‌نظر می‌رسدکه ۴-نونیل فنل به‌وسیلهٔ عملکردی مشابه با ۱۷-بتا استرادیول

اما با قدرت کم‌تر قادر به تحریک کبد به‌منظور سنتز ویتلوژنین و در نهایت افزایش اندازهٔ آن می‌باشدکه این افزایش ناشی از تکثیردستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی جهت تولید و تغییر ویتلوژنین است که هایپرپلازی (افزایش درتعداد سلول‌ها) ویا هایپرتروفی (بزرگ شدن بیش از اندازهٔ سلول‌ها) سلول‌های کبدی را به‌دنبال دارد (Arukwe و Goksoyr، ۱۹۹۸). در مطالعه حاضر هم‌چنین سطوح هورمون‌های جنسی پلاسما در جنس نر و ماده کپورکوی نابالغ دستخوش تغییر شد، به‌طوری‌که سطح استرادیول درجنس نر و ماده در غلظت متوسط نونیل فنل (۵۰ میکروگرم بر گرم) افزایش معنی‌داری داشت، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم برگرم) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. هم‌چنین سطوح ۱۷-بتا استرادیول در تیمار ۲میکروگرم برگرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه شاهد داشت($P<۰/۰۵$). میزان هورمون تستوسترون نیز در جنس ماده در دوز ۱۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل و تیمار ۲ میکروگرم بر گرم ۱۷-بتااسترادیول افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت، اما در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم روند کاهشی‌داشت. هم‌چنین در جنس نر در تمامی تیمارهای نونیل فنل روند یکسانی مشاهده شد و تغییرات معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). ۱۷-بتا استرادیول ($E_۲$) یک هورمون طبیعی است که بروز صفات جنس ماده، بلوغ و عملکرد اندام‌های جنسی را تحت تأثیر قرار می‌دهدو هم‌چنین این هورمون در سیستم نورو آندوکرینی و سیستم اسکلتی نیزشرکت می‌کند (Leroy و همکاران، ۱۹۹۶). پتانسیل نونیل فنل به‌عنوان یک ترکیب مختل کننده سیستم درون‌ریز تنها ۰/۰۲۳ پتانسیل استروژن طبیعی ۱۷-بتااسترادیول می‌باشد(Soares و همکاران، ۲۰۰۸). آنزیم‌های سیتوکروم P۴۵۰ در متابولیسم و بیوسنتز استروئیدهای داخلی بدن نقش دارند و رابطه معکوسی بین فعالیت CYPA۱ و میزان استرادیول در پلاسماوجوددارد، به‌طوری‌که CYPA۱ درمتابولیزه کردن استروئیدها (به‌ویژه استروژن) نقش دارد (Swanson و همکاران،۱۹۹۱). بنابراین در مطالعه حاضر افزایش تدریجی میزان استرادیول در غلظت ۱۰ و افزایش معنی‌دار آن در غلظت ۵۰ میکروگرم بر گرم می‌تواند به‌دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده استروئیدها در اثر تأثیر نونیل فنل باشد. روند این افزایش در ماهیان ماده در مقایسه با ماهیان نر بیش‌تر بوده است، که این امر نشان‌دهندهٔ خاصیت شبه استروژنی ماده نونیل فنل می‌باشد. علاوه بر آن پروتئین تنظیمی حاد استروئید ساز StAR و P۴۵۰ Scc به‌عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی در تولید استروئیدها می‌باشد. به‌همین دلیل می‌توان افزایش میزان استرادیول را به افزایش فعالیت آنزیم‌های استروئیدساز ناشی از مواجهه با نونیل فنل نسبت داد (Soto و همکاران، ۱۹۹۷). Giesy و همکاران (۲۰۰۰) در تحقیقی بر روی ماهیان بالغ نر و ماده قنات سرچربی که قبل از شروع فصل تخم‌ریزی به‌مدت ۴۲روز درمعرض‌نونیل فنل قرار داشتند، نشان دادند که سطح $E_۲$ در پلاسما در هر دو جنس ماهی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. هم‌چنین غلظت استروژن کل در پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل ۹۵٪ افزایش پیدا کرد که قسمت عمدهٔ آن ناشی از افزایش $E_۲$ در پلاسما می‌باشد. در این مطالعه بیان شد که مکانیسم اثر نونیل فنل به‌صورت مستقیم از طریق فعالیت آگونیستی نسبت به استروژن نبوده و احتمالاً نونیل فنل به‌صورت غیرمستقیم اثر خود را اعمال کرده است (Giesy و همکاران، ۲۰۰۰).

Yang و همکاران (۲۰۰۸) نیز به‌مدت ۲۱ روزماهی‌حوض طلائی (*Carassius auratus*) بالغ نر را در معرض غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل قرار دادند که نونیل فنل باعث افزایش معنی‌دار در میزان استروژن‌ها ($E_۱$, $E_۲$) شد. این درحالی بود که میزان تستوسترون کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که نونیل فنل در غلظت‌های بالاتر از ۱۰میکروگرم در لیتر قادر به ایجاد اثرات استروژنی از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم می‌باشد که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در بررسی دیگری که توسط Arukwe و Meucci (۲۰۰۵) در مواجهه تخمک‌گذاری پری‌ویتلوژنیک (پیش‌زرده‌سازی) روغن ماهی اقیانوس اطلس با ۴-نونیل فنل در شرایط in vitro از طریق تأثیر بر میزان بیان پروتئین‌های StAR و P۴۵۰ Scc انجام شد، نونیل فنل باعث ایجاد اختلال فرآیند ساخت استروئیدها و هم‌چنین اختلال در تعادل هورمونی شد. در این تحقیق نیز بیان StAR و P۴۵۰ Scc بعد از ۱۴ روز به‌طور ثابت‌ویکنواختی از تیمارشاهد تا تیمارهای ۱ و ۱۰ میکرومول نونیل فنل افزایش و در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول، کاهش یافت. هم‌چنین مقادیر $E_۲$ و ۱۱-KT نیز در ۱۴روز در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کاهش پیدا کرد (Arukw و Goksoyr، ۱۹۹۸). مطالعات پیشین نشان دادند که نونیل فنل باعث مهار گلوکورونیداسیون و سولفاسیون استروئیدهای جنسی می‌شود، بنابراین مهار و کاهش میزان گلوکورونیداسیون و سولفاسیون کبد در نتیجهٔ تأثیر نونیل فنل عامل افزایش استرادیول در مطالعه حاضر و افزایش تستوسترون در غلظت ۱۰ میکروگرم نونیل فنل در جنس ماده می‌باشد. از سوی دیگر در مطالعات گذشته گزارش شده است که نونیل فنل باعث مهار آنزیم ۱۷-آلفا هیدروکسیلاز می‌شود (Laurenzana و همکاران، ۲۰۰۲)،که

این آنزیم در سنتز تستوسترون نقش‌دارد. بنابراین کاهش تستوسترون مشاهده شده در ماهیان نر و ماده مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از مهار این آنزیم در غلظت‌های ۵۰و ۱۰۰ میکروگرم برگرم نونیل‌فنل‌در جنس ماده و هم‌چنین تمامی غلظت‌های نونیل فنل در جنس نر باشد. Martin-Skilton و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی بر روی ماهی turbot نشان دادند که نونیل فنل باعث کاهش معنی‌داری در سطح هورمون‌ها استرادیول و تستوسترون در پلاسما و هم‌چنین کاهش آنزیم آروماتاز در تخمدان و کاهش میزان گلوکورونیداسیون استروئیدها جنسی می‌شود. در این بررسی میزان هورمون پروژسترون نیز در جنس ماده در تمامی غلظت‌های نونیل فنل روند یکسانی داشته اما میزان آن در تیمار ۲ میکروگرم برگرم ۱۷-بتااسترادیول کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p<0/05$). هورمون پروژسترون یک استروئید۲۱ کربنه‌است که‌در طی چرخه تخمک‌گذاری طبیعی از جسم زرده ترشح می‌شود.هورمون پروژسترون و مشتقات آن ازطریق اثر گنادوتروپین‌ها روی سلول‌های فولیکولی تخمدان سنتز می‌شوند و با تاثیر بر بلوغ اووسیت‌هاعمل خود را نشان می‌دهند(Harris و همکاران، ۲۰۰۱). در این بررسی تاثیر شبه‌استروژنی نونیل‌فنل‌در رقابت با ۱۷-بتااسترادیول از طریق اتصال به گیرنده‌های پروژسترون و استروژن سبب کاهش در میزان پروژسترون شد.

زنواستروژن‌هائی‌نظیر نونیل‌فنل‌می‌توانند‌از طریق اثر بازدارندگی در بخش‌های‌مختلف محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد و تاثیر بر گیرنده‌های ترشح هورمونی سبب تغییر در ترشح هورمون‌ها شوند. در بررسی Ael Sayed و همکاران (۲۰۱۲) مشخص شد که نونیل فنل می‌تواند سبب کاهش در ترشح LH، FSH و غلظت تستوسترون در *Clarias gariepinus* شود. اما در این بررسی سطح ۱۷-بتااسترادیول افزایش یافت. در بررسی دیگری که تاثیر زنو استروزنی نونیل فنل در شرایط invitro و invivo توسط Laws و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد، نتایج نشان داد که نونیل فنل سبب کاهش در میزان پروژسترون و تستوسترون، ازطریق اتصال به گیرنده‌های پروژسترون و استروژنی شده است.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که نونیل فنل قادر به تحریک سنتز ویتلوژنین و تغییر در میزان ترشح هورمون‌های استروئیدی در جنس نر و ماده ماهی کپور کوی نابالغ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت‌ازپژوهشگران و فناوران کشور به‌دلیل حمایت مالی و نیزکارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی و تمامی کسانی که در انجام مراحل مختلف این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

۱. **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. Vol. 28, pp: 1143-1152.

۲. **Archand, L.D. and Benson, W.H., 1998.** Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 17, pp: 49-57.

۳. **Arukw, A. and Goksoyr, A., 1998.** Xenobiotics, Xenoestrogens and Reproduction Disturbances in Fish. Sarsia.Vol. 83, pp: 225-241.

٤. **Christiansen, T.; Korsgaard, B. and Jespersen, A., 1998**. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17 β-estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout *(Zoarces viviparous)*. Marine Environmental Research. Vol. 46, pp: 141-144.

۵. **Colborn, T.; Saal, F.S. and Soto, A.M., 1993.** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspectives. Vol. 101, pp: 3378-3841.

٦. **Coldham, NG.; Sivapathasundaram, S.; Dave, M.; Ashfield, L.A.; Pottinger, TG.; Goodall, C. and Sauer, M.J., 1998.** Biotransformation, tissue distribution and persistence of 4-nonylphenol residues in Juvenile rainbow trout. Drug Metabolismand Disposition. Vol. 26, pp: 347-354.

۷. **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. Vol. 15, pp: 143-151.

۸. **Follett, B.K. and Redshaw, M.R., 1974.**The physiology of vitellogenesis. In: Lofts B (ed) Physiology of the amphibia, Academic Press, New York, Vol. 2, PP: 219-308.

۹. **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-nonylphenol on fecundity and biomarkers of Estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas).* Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 19, pp: 1368-1377.

۱۰. **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. Vol. 58, pp: 90-95.

۱۱. **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. Vol. 103, pp: 9-15.

parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17βestradiol. General Comparative Endocrinology. Vol. 142, pp: 280-288.

۲۶. **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. Vol. 73, pp: 1-10.

۲۷. **Ottobre, J.S.; Houmard, B.S. and Ottobre, A.C., 1989.** Luteal production of steroids and prostaglandins during stimulated early pregnancy in the primate: differential regulation of steroid production by chorionic gonadotropin. Biol. Reprod. Vol. 41, pp: 393-400.

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

۲۹. **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. Vol. 12, pp: 310-321.

۳۰. **Sayed Ael, D.; Mahmoud, U.M. and Mekkawy, I.A., 2012.** Reproductive biomarkers to identify Endocrine disruption in Clarias gariepinus exposed to 4-nonylphenol. Ecotoxicol Environ. Vol. 78, pp: 310-319.

۳۱. **Schmidt, K.; Steinberg, C.E.W.; Pflugmacher, S. and Staaks, G.B.O., 2005.** Xenobiotic substances such as PCB mixtures Aroclor 1254) and TBT can influence swimming behavior and biotransformation activity (GST) of carp (*Cyprinus carpio*). Environ Toxicol. Vol. 19, pp: 460-470.

۳۲. **Schwaiger, J.; Mallow, U.; Ferling, H.; Knoerr, S.; Braunbeck, T.; Kalbfus, W. and Negele, 2002.** How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. Aquatic toxicology. Vol. 59, pp: 177-189.

۳۳. **Snyder, S.A.; Keith, T.L.; Pierens, S.L.; Snyder, E.M. and Giesy, J.P., 2001.**Bioconcentrat- ion of nonylphenol in fathead minnows *(Pimephales promelas).* Chemosphere. Vol. 44, pp: 697-702.

۳۴. **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. Vol. 34, pp:1033-1049.

۳۵. **Soto, A.M.; Justica, H.; Wray, J.W. and Sonnenshein, C., 1997.** P-nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. Environmtal Health Perspective. Vol. 92, pp: 167-173.

۳۶. **Swanson, P.; Suzuki, K.; Kawauchi, H. and Dickhoff, W.W., 1991**. Isolation and characterization of two Coho Salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. Biology of Reproduction. Vol. 44, pp: 29-38.

۳۷. **Verslyke, T.; Vandenbergh, G.F.; Versonnen, B.; Arijs, K. and Janssen, C.R., 2002.** Induction of vitellogenesis in ۱۷α-ethinylestradiolexposed rainbowtrout *(Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. Comparative Biochemistry Physiology. Vol. 132, pp: 483-492.

۳۸. **Yang, L.; Lin, L.; Weng, S.; Feng, Z.L. and Uan, T., 2008.** Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp *(Carassius auratus)* in

۱۲. **Harris, C.A.; Santos, E.M.; Janbakhsh, A.; Pottinger, T.G. and Tyler, C.R., 2001.** Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. Environmental science and technology. Vol .35, pp: 2909-2916.

۱۳. **Hiramatsu, N.C.; heek, A.O.; Sullivan, C.V.; Matsubara, T. and Hara, A., 2005.** Vitellogenesis and endocrine disruption. In: T.P. Mommsen & T.W. Moon, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Vol. 6, pp: 431-471.

۱۴. **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. Vol. 15, pp: 194-202.

۱۵. **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. Vol. 27, pp: 361-372.

۱۶. **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*). Journal of Expreimental Biology. Vol. 203, pp: 171-181.

۱۷. **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. Vol. 50, pp: 11-17.

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

۱۹. **Laurenzana, E.M.; Balasubramanian, G.; Weis, C.; Blaydes, B.; Newbold, R.R. and Delclos, K.B., 2002**. Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. Chemico-biological interactions. Vol. 139, pp: 23-41.

۲۰. **Laws, S.C.; Carey, S.A.; Ferrell, J.M.; Bodman, G.J. and Cooper, R.L., 2000**. Estrogenic activity of octylphenol, nonyl phenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. Toxicol Sci.Vol. 54, pp: 154-167.

۲۱. **Lee, P.C. and Lee, W., 1996.** In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 57, pp: 341-348.

۲۲. **Leroy, C.; Folmar, I. and Denslow, N.D., 1996.** Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp *(Cyprinus carpio)* Captured near a Major Metropolitan Sewage TreatmentPlant. Environmental Health Perspect. Vol. 104, pp: 1098-1110.

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

۲۴. **Martin-Skilton, R.; Thibaut, R. and Porte, C., 2006.** Endocrine alteration in juvenile cod and turbot exposed to dispersed crude oil and alkylphenols. Aquatic Toxicology. Vol. 78, pp: 57-64.

۲۵. **McCormick, S.D.; Dea, M.F.; Moeckel, A.M..; Lerner, D.T. and Bjornsson, B.T., 2005.** Endocrine disruption of

aquaticmicrocosms. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 71, pp: 400-411.

٣٩. **Zar, J.H., 1999**. Blostatistical Analysis. Prentic Hall. (4th Edition) New Jersey. 663 p.

٤٠. **Zha, J.; Wang, Z.; Wang, N. and Ingersoll, C., 2007.** Histological alternation and vitellogenin Induction in adult rare minnow *(Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. Chemosphere. Vol. 66, pp: 488-495.

٤١. **Zhang, Y.; Qu, Q.; Sun, D.; Liu, X. and Suo, L., 2011.** Vitellogenin in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): induction, purification and changes during the reproductive cycle. J. Appli. Ichthyol. Vol. 27, pp:660–665.