اثر مخرب نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون ۱۷ بتا – استرادیول و بافت تخمدان در ماهی زبرا سیچلید (*Cichlasoma nigrofasciatum*)

طاهره مکتبی[1*]، مهدی روستایی[2]، مهدیه مهدوی[3]، نیلوفر نصیری[4] و همایون حسین زاده صحافی[5]

۱– گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۲– گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
۳– گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۴– دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین
۵ – سازمان تحقیقات شیلات ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۰

چکیده

پژوهش حاضر اثر اخلال گر هورمونی، ماده نونیل فنل اتوکسیلات را که یک آگونیست ضعیف گیرنده استروژن است، بر تولید هورمون ۱۷ بتا – استرادیول و بافت تخمدان، در ماهی‌های زبرا سیچلید نابالغ (*Cichlasoma nigrofasciatum*) مورد بررسی قرار داده است. برای تعیین اثر نونیل فنل اتوکسیلات بر هورمون جنسی استرادیول در زبرا سیچلید، ماهی‌ها به سه گروه وزنی کمتر از ۴ گرم، ۵ – ۴ گرم و بیشتر از ۵ گرم تقسیم شده و به مدت ۶۰ روز در آکواریوم‌های شیشه‌ای در معرض سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نونیل فنل اتوکسیلات قرار گرفتند. در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر، تولید هورمون ۱۷ بتا – استرادیول به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۱$). تغییرات ویژه در غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر این ماده دیده شد. میزان استرادیول اندازه گیری شده در این آزمایش ۰/۷۰–۰/۱۳ نانوگرم بر میلی لیتر سرم ثبت شد. اندازه گیری میزان هورمون استروییدی ۱۷ بتا – استرادیول، نشان دهنده اثر استروژنیک نونیل فنل اتوکسیلات با غلظت بیش از ۱۰ میکروگرم بر لیتر این ماده است. در غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر بیشتر اووسیت‌ها در مرحله پایانی ویتلوژنز مشاهده شدند.

واژگان کلیدی: نونیل فنل اتوکسیلات، اخلال گر هورمونی، *Cichlasoma nigrofasciatum*، اووسیت

* **نگارنده پاسخگو:** tnm_maktabi@yahoo.com

مقدمه

مواد شیمیائی اخلال گر دستگاه درون ریز (اخلال گرهای هورمونی)، پاسخ استروژنیک را با تقلید و یا محدود کردن عمل استروژن نشان می‌دهند. (Cakmak *et al*., 2006). در پژوهش حاضر عملکرد نونیل فنل اتوکسیلات، به عنوان یک اخلال گر استروژنیک دستگاه درون‌ریز، بر روی ماهی زبرا سیچلاید نابالغ مورد بررسی قرار گرفته است. این ماده ازآلکیل فنل‌ها و نانیونیک سورفکتانت هایی است که با غلظت بالا در محیط‌های آبی حضور دارند (Ahel *et al*., 1994). آلکیل فنل های مختلف قادر به جایگزین شدن بر روی گیرنده‌های استرادیول بوده و شباهت ساختار ملکولی آن‌ها با استرادیول قابل توجه است و همچنین ازاتصال استرادیول به گیرنده آن جلوگیری می‌کنند. به دلیل ساختار نونیل فنل اتوکسیلات ها، آن‌ها قادرند فشار کششی بین دو فاز، مانند فازهای هوا/ آب، روغن / آب یا آب / غشاهای بیولوژیک را کاهش دهند. این ویژگی سبب استفاده گسترده از این مواد شده است. خواص نونیل فنل که اثر فعالی بر کشش سطحی دارد، باعث شده در تعداد بسیار زیادی از فرآورده‌ها مانند پاک کننده‌ها و شوینده‌ها، عایق‌ها، امولسیفایرها، آفت کش ها، لاک‌ها، مواد آرایشی مثل کرم‌ها و رنگ موها و همچنین در فرآوری منسوجات، فرآوری خمیر کاغذ، فورمولاسیون رزین و رنگ، پالایش نفت و گاز، تولید برق و در موم برای میوه و سبزیجات و به عنوان رزین و پلیمر در بسته‌بندی و پلاستیک‌های پلی اتیلن و حتی در اسپرم کش‌ها کاربرد داشته باشند. نونیل فنل، یک آگونیست ضعیف گیرنده استروژن است. افزایش غلظت نونیل فنل نسبت گیرنده‌های استروژنی را که به آن متصل می‌شوند، افزایش می‌دهد. مکانیسم کلی عملکرد هورمون‌های استروئیدی بدین ترتیب است که اتصال گیرنده با هورمون استروئیدی در سیتوزول صورت گرفته و پس از اتصال گیرنده دستخوش تغییرات ساختمانی خاص می‌گردد. به این ترتیب مجموعه گیرنده – هورمون توانائی اتصال با بخش‌هائی از DNA را پیدا نموده که معروف به جایگاه‌های پذیرنده (Acceptor sites) می‌باشند. به دنبال این اتصال سطح فعالیت آنزیم RNA پلیمراز II بشدت افزایش یافته و منجر به افزایش تولید mRNA می‌گردد. در نهایت با تحریک هستک، تولید RNA افزایش یافته و سنتز پروتئین درون سلول را افزایش می‌یابد. تنظیم فعالیت هورمون‌های استروئیدی در سطح گیرنده‌ها وابسته به تراکم هورمون در بافت هدف می‌باشد (حسین زاده صحافی، ۱۳۸۰). این پژوهش به منظور بررسی اثرات شبه هورمونی ماده نونیل فنل اتوکسیلات در ماهی زبرا سیچلید ماده، شامل تغییر در میزان هورمون جنسی ماده (۱۷ – بتا استرادیول) و نیز تغییرات بافتی تخمدان در ماهی نامبرده انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

ماده نونیل فنل اتوکسیلات Nonylphenolethoxylate با خلوص ۹۹٪، از شرکت کیمیاگران امروز تهیه گردید. اتانول خالص از شرکت (Merch, Darmstaat Germany) تهیه شد. Tagهای رنگی الاستومر از شرکت CIST (Canadian Institute of Science and Technology) تهیه شدند.

ماهی‌های مورد آزمایش با نام علمی *Cichlasoma nigrofasciatum* در سال ۱۳۸۹ به تعداد ۸۴۰ قطعه خریداری شدند. میانگین وزن ماهی‌ها ۰/۰۱ ± ۳/۱۳ گرم و میانگین طول ۰/۰۲±۴۸/۹۲ میلی متر بود. توزین ماهی‌ها با ترازوی دیجیتال (ساخت شرکت Mettler سویس با مدل College) با دقت ۰/۰۱ گرم و طول استاندارد با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۵ اندازه گیری و ثبت گردید. تمامی مراحل اجرایی این تحقیق در مرکز تکثیر و پرورش ماهی کریمی واقع در رزکان کرج، از تاریخ مهر ماه سال ۱۳۸۹ تا پایان آذر ماه همان سال انجام گرفت.

تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50})

تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی برای آزمایش تعیین غلظت نیمه کشنده (LC50) مورد استفاده قرار گرفتند. در هر آکواریوم، تعداد ۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد. برای تعیین دوز نیمه کشنده به مدت ۹۶ ساعت از ۵ تیمار و سه تکرار به ترتیب به صورت: تیمار کنترل یا شاهد که بدون اتانول و ماده نونیل فنل اتوکسیلات بود، تیمار بلانک یاکنترل مثبت که فقط دارای اتانول بود، و تیمارهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل اتوکسیلات حل شده در اتانول خالص بودند، تعیین شدند. ابعاد آکواریوم‌ها ۳۰×۴۰×۱۰۰ سانتی متربود. پس از ضدعفونی کردن, آکواریوم‌ها با آب هم دما با محیط سالن پرورش ماهی که هوادهی می‌شدند، پر شده و دمای آب آکواریوم‌ها در طول دوره پرورش، توسط دستگاه‌های گرم کننده ثابت نگه داشته شدند (Norouzitalleb *et al*., 2008). نوردهی سالن به طور طبیعی و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. تهویه سالن توسط یک تهویه مرکزی صورت گرفت. از ۲۴ ساعت قبل و در طول آزمایش به ماهیها غذا داده نشد. در پایان هرروز تلفات و غذاهای خورده نشده، با سیفون کردن، از آکواریوم‌ها خارج شده و تعداد ماهی‌های زنده هر تانک شمارش و یادداشت شد. در مدت آزمایش تعیین محدوده مناسب و آزمایش اصلی، دمای هوای سالن پرورش ۳۰ درجه سانتی گراد و دمای آب به طور متوسط ۲۹ درجه سانتی گراد بود. در پایان ۹۶ ساعت، غلظت نیمه کشنده (LC50)،µg/L ۲۵۰ تعیین شد.

آزمایش رشد

در این آزمایش در هر یک از ۱۵ عدد آکواریوم شیشه‌ای ۳۶ قطعه ماهی سیکلید زبرا قرار داده شد. برای کاستن از احتمال بروز خطا در آزمایش و همین طور برای ایجاد شرایط یکسان برای همه تیمارها از نظر نور و دما و دیگر فاکتورهای محیطی، طرز قرارگیری تکرارهای هر تیمار به صورت تصادفی تعیین شد. این آزمایش دارای ۵ تیمار و ۳ تکرار بود (یوسفیان، ۱۳۸۴). پس از دو هفته بر اساس قابلیت‌های رشد، ماهی‌ها به سه گروه وزنی (کمتر از ۴ گرم, ۵-۴ گرم و بیشتر از ۵ گرم) تقسیم شدند. به منظور جداسازی گروه‌ها از یکدیگر از Tag های رنگی الاستومر انستیتوی علوم وتحقیقات کانادا Canadian (Institute of Science and Technology), CIST استفاده شد. اندازه کوچک‌تر از ۴ گرم با رنگ قرمز، اندازه ۵ – ۴ گرم با رنگ سبز و اندازه بزرگ‌تر از ۵ گرم با رنگ زرد علامتگذاری شدند. برای ایجاد سازگاری با شرایط جدید، پس از ۳ روز آزمایش انجام گرفت. آب مورد استفاده، آب لوله کشی منطقه بود. روزانه ماهی‌ها حدود ۴-۳ درصد وزن بدنشان با غذای تترا ساخت کشور آلمان که با استفاده از ترازوی دیجیتال، (مدل MH-Series ساخت کشور چین) با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شده بود، در ۲ وعده، ۸ صبح و ۴ بعد ازظهر، مورد تغذیه قرار گرفتند (هاشمی، ۱۳۷۵). دمای آب آکواریوم‌ها در طول مدت پرورش ماهی‌ها ۰/۵ ± ۲۹ درجه سانتی گراد بود. رنج pH آب ۷/۷ – ۷ /۲ و سختی آب ۸۰ میلی گرم بر لیتر بود. با استفاده از فیلتر کننده و هوادهی مناسب و همچنین هیترها، شرایط مناسب و اکسیژن مورد نیاز تأمین شده و هم دمایی در آکواریوم‌ها صورت گرفت. مقادیر متفاوتی از ماده نونیل فنل اتوکسیلات به صورت محلول در مقدار مساوی اتانول خالص به آب هر آکواریوم اضافه گردید. یک تیمار شاهد (بدون ماده نونیل فنل و الکل) و یک تیمار کنترل مثبت با حجم مساوی از اتانول نیز تعیین گردید و تیمارها در سه تکرار و به مدت ۶۰ روز برای پرورش ماهیان زبرا سیچلید در نظر گرفته شدند. در پایان هر هفته، به میزان ۱۰٪ از آب هر آکواریوم با آب تصفیه شده هم دما تعویض شد و فضولات و غذاهای خورده نشده و تلفات احتمالی از آکواریوم‌ها خارج شدند. در پایان ماه

دوم، ماهی‌ها را با عصاره آویشن بیهوش کرده و پس از اطمینان از بیهوشی آنها، ساقه دمی را قطع نموده و با لوله‌های مویینه هماتوکریت خونگیری انجام گرفت. در نهایت حدود 1cc از خون مورد نیاز برای اندازه گیری هورمون ۱۷ – بتا استرادیول با جمع آوری خون از ۸-۷ ماهی با مخلوط کردن (Pooling) برای هرنمونه در زمان حدود ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس خون‌های هر گروه در لوله‌های آزمایش درب دار استریل و هپارینه برای جداسازی پلاسما منتقل شدند. (Wang &Tsai, 2000). در مرحله بعد، خون‌ها با دستگاه سانتریفیوژ، مدل Labofuge 200، شرکت Heraeus Spatech، ساخت کشور آلمان، به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و سرم مربوطه در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شد (Pottinger & Carrick, 2001) و بررسی هورمون ۱۷ بتا – استرادیول در آزمایشگاه انجام گرفت.

اندازه گیری هورمون با واحد نانوگرم در میلی لیتر با استفاده از روش Radioimmunoassay بر اساس واکنش رقابتی بین هورمون موجود در سرم با هورمون نشاندار شده با ید رادیواکتیو ۱۲۵ جهت اتصال به آنتی بادی ضد هورمون در فاز جامد انجام گرفت (Goodbred *et al*., 1997). این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design)، برنامه ریزی و اجرا گردید.

مطالعه بافتی

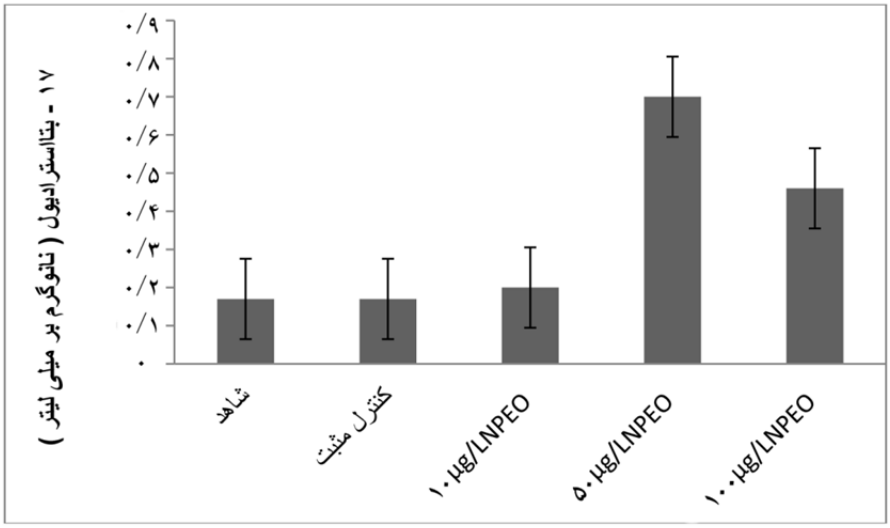
پس از خونگیری از ساقه دمی ماهی‌ها در تیمارهای مختلف رشد، گنادها از بدن جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن نگهداری شدند. پس از قالب گیری به وسیله میکروتوم مدل SLEE MAINS COT 4000 SLEE Technic Gmbh، از آنها برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۷ میکرومتر تهیه شد. برش‌ها به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، رنگ آمیزی و بررسی شدند.

آنالیز آماری

برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel و برای آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای کنترل همگنی آنها از Kromongolov - Smirnov استفاده شد. برای بررسی تغییرات هورمون β 17- استرادیول، تحت تأثیر مقادیر مختلف نونیل فنل اتوکسیلات، از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) به منظور معرفی تفاوت‌ها در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها و آزمون دانکن، به عنوان Post hoc برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

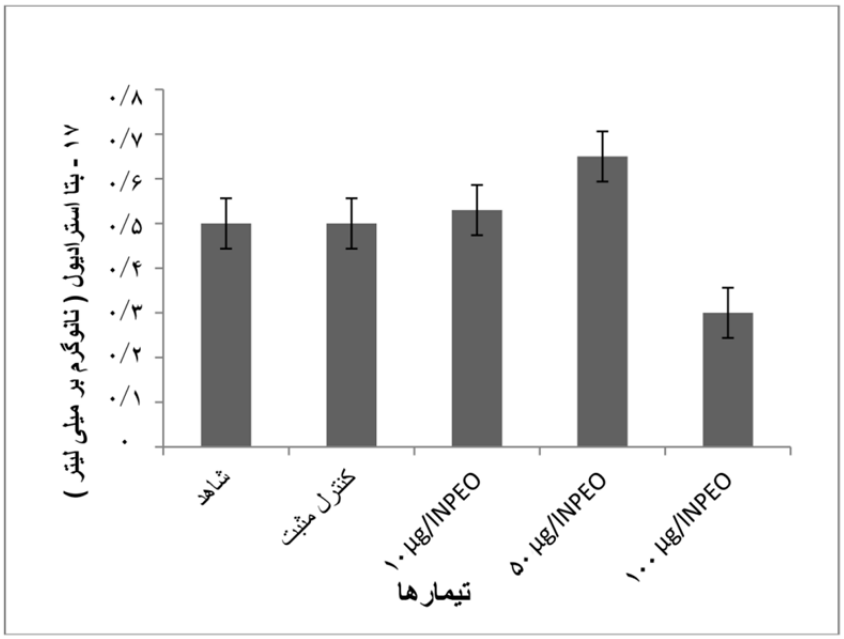
نتایج

در ماهی‌های با وزن کمتر از ۴ گرم، بین تیمار ۱۰ میکروگرم در لیتر و گروه شاهد وکنترل مثبت اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p<۰/۰۱$). بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر با تیمارهای ۱۰ میکروگرم در لیتر و شاهد و کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). همچنین اختلاف بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ نیز معنی‌دار ثبت شد ($p<۰/۰۱$). در عین حال بیشترین مقدار افزایش هورمون استرادیول در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد و در مقایسه با تیمار ۵۰ افزایش هورمون استرادیول در تیمار ۱۰۰ کمتر است. افزایش هورمون در تیمار ۵۰ نسبت به کنترل‌ها بیش از سه برابر بوده و در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نسبت به تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر افزایش هورمون استرادیول کمتر بود (شکل ۱).



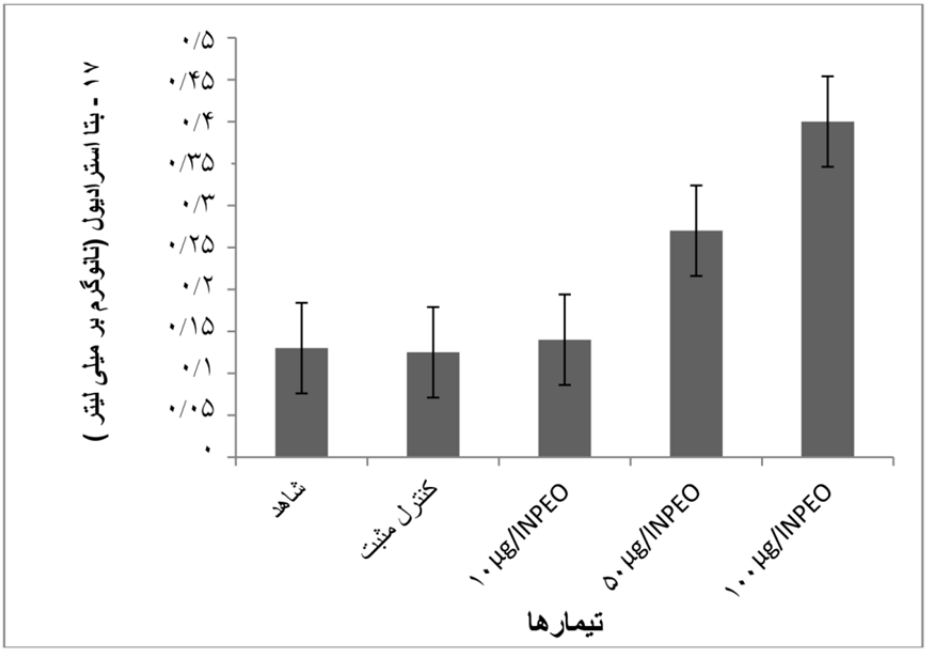
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف نونیل فیل اتوکسیلات بر میزان هورمون ۱۷ بتا - استرادیول در ماهی‌های با وزن کمتر از ۴ گرم (آنتنک‌ها معرف انحراف معیارمی باشند)

در ماهی‌های با وزن ۵ – ۴ گرم، بین تیمارهای کنترل با هم و تیمار ۱۰ اختلاف معنی‌داری دیده نشد ولی بین تیمارهای کنترل و تیمار ۱۰ با تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$). بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ نیز اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<0.01$). در عین حال بیشترین افزایش هورمون مربوط به تیمار ۵۰ بود و در تیمار ۱۰۰ کاهش هورمون مشاهده شد (شکل ۲).



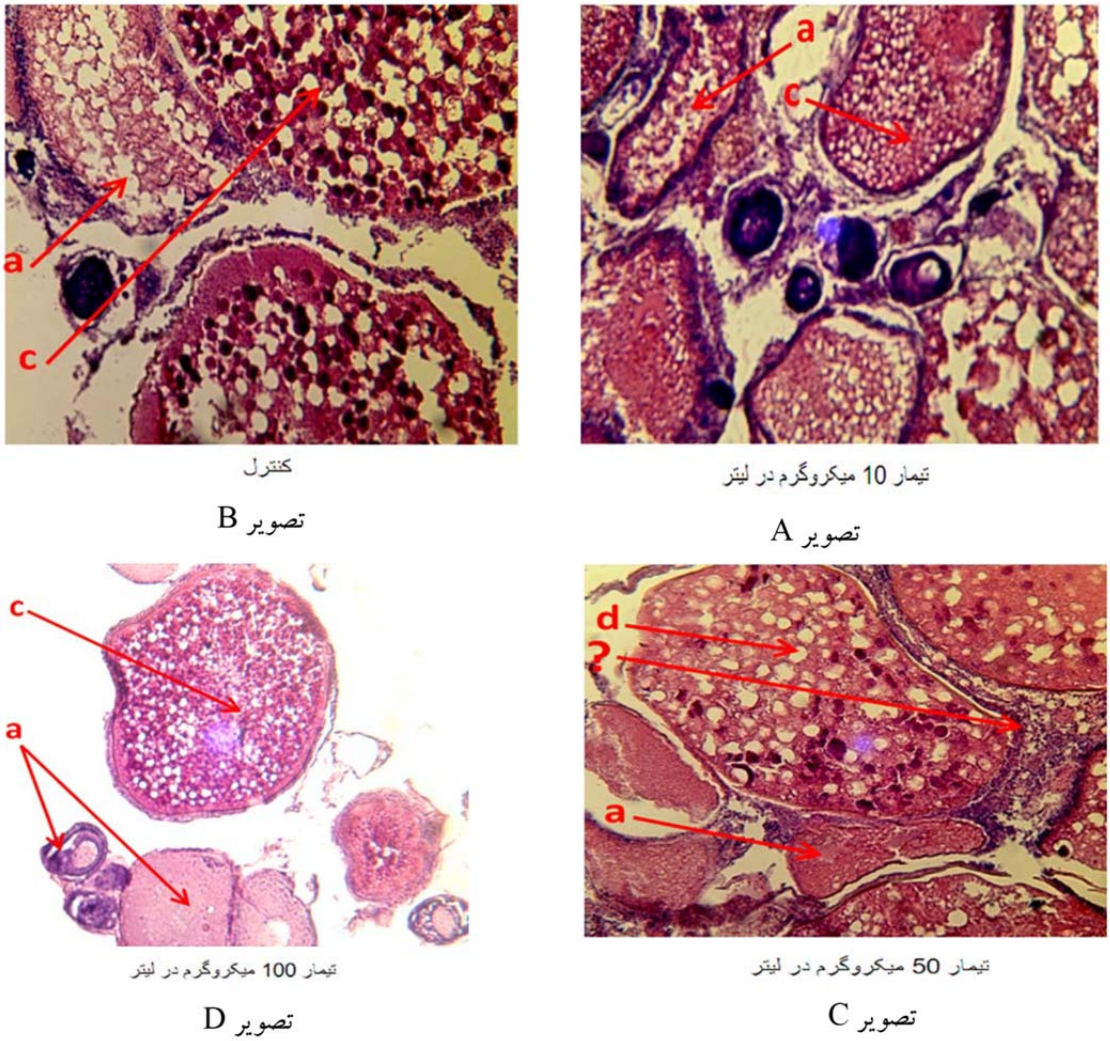
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون ۱۷ بتا - استرادیول در ماهی‌های با وزن ۵-۴ گرم (آنتنک‌ها معرف انحراف معیار می‌باشند)

در ماهی‌های با وزن بیش از ۵ گرم بیشترین افزایش میزان هورمون مربوط به تیمار ۱۰۰ و کمترین افزایش مربوط به تیمار ۱۰ بود. اختلاف بین تیمارهای کنترل و تیمار ۱۰ معنی‌دار نبوده ولی بین این تیمارها با تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). بین تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ نیز اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۱$) (شکل ۳).



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون ۱۷ بتا – استرادیول در ماهی‌های با وزن بیشتر از ۵ گرم (آنتنک‌ها معرف انحراف معیار می‌باشند)

در بررسی هیستولوژیک تخمدان در ماهی زبرا سیچلید در گروه کنترل و تیمار ۱۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل اتوکسیلات، فولیکول‌های در حال رشد دیده شدند. در برش تخمدان در این تیمارها اووسیت‌های رشد یافته در پایان ویتلوژنز را نیز می‌توان مشاهده نمود و بین این دو تیمار تفاوتی دیده نمی‌شود. در برش مربوط به تیمار ۵۰ اووسیت‌های رشد یافته در حال زرده سازی دیده می‌شوند. در برش مربوط به تیمار ۱۰۰ اووسیت‌های درحال رشد و اووسیت‌های رشد یافته در پایان ویتلوژنز مشاهده می‌شوند. بیشترین تفاوت در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد. در این تیمار بیشتر فولیکول‌ها در حال زرده سازی دیده می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۴ - تصاویر میکروسکپ نوری برش بافت تخمدان در ماهی زبرا سیچلید Cichlasoma nigrofasciatum (400×) در شکل برش‌ها در تیمارهای کنترل و ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نشان داده شده‌اند. a اووسیت در حال رشد، b اووسیت بالغ، c و d اووسیت‌ها را در پایان ویتلوژنز نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

استروئیدهای جنسی در بدن ماهی ساخته شده و به جریان خون وارد می‌شوند تا به اندام‌های هدف تحویل داده شوند. ۶۰ درصد این استروئیدها به طور ضعیف با آلبومین و حدود ۳۸ درصد به گلوبولین باند شونده با هورمون جنسی متصل می‌شوند. فقط ۲ تا ۳ درصد هورمون‌ها در پلاسما آزاد می‌مانند. هورمون‌های متصل شده با پروتئین‌ها غیر فعالند و فقط هورمون‌های آزاد، از نظر بیولوژیک فعالند (Yang *et al*., 2008) در این پژوهش تنها هورمون‌های آزاد مورد بررسی قرار گرفتند.

در پژوهش حاضر، تغییرات میزان هورمون ۱۷ بتا – استرادیول (E2) در پلاسمای خون و همچنین تغییرات بافت تخمدان ماهی زبرا سیچلید تحت تأثیر ماده نونیل فنل اتوکسیلات مورد بررسی قرار گرفتند. فاضلاب‌های تصفیه شده که به آب‌های جاری تخلیه می‌شوند دارای خواص استروژنیک هستند (Purdom *et al*., 1994) و همچنین نونیل فنل یک نوع ماده

شیمیایی صنعتی است که در فاضلاب‌ها (Ahel & Giger, 1985; Lye et al., 1999)، آب رودخانه‌ها (Ahel *et al*., 1994; Blackburn and Waldock, 1995) و در بافت‌های ماهی‌ها (Ahel *et al*., 1993; Lye *et al*., 1999) یافت می‌شود.

برای بررسی تأثیر این ماده بر موجودات زنده، در پژوهش حاضر ماهی‌های *Cichlasoma nigrofasciatum* در سه گروه وزنی کمتر از ۴ گرم، ۵ – ۴ گرم و بیشتر از ۵ گرم، به مدت ۶۰ روز در معرض غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ µg/L نونیل فنل اتوکسیلات قرار گرفتند. این زمان نسبت به زمان آزمایش‌های مشابه طولانی‌تر بود، اما برای پی بردن به آنچه که برای ماهی‌هایی که در طبیعت در معرض ماده نونیل فنل اتوکسیلات قرار دارند، حتی دوره‌های طولانی تربررسی نسبت به آنچه که در این آزمایش بود، مورد نیاز است. به علاوه تعداد زیادی ماهی برای این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند n=۳۶ (در هر تیمار). سمیت مشاهده شده در این پژوهش سایر پارامترهای اندازه‌گیری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. می‌توان با مونیتور کردن تراکم گنادوتروپین ها، به بررسی این موضوع پرداخت که آیا تاثیرات منفی ایجاد شده به علت خواص اخلال در هورمون‌ها (Endocrine disrupting) نونیل فنل اتوکسیلات و یا به علت تاثیرات ناشناخته سمی این ماده است. با این حال وزن ماهی‌های باقیمانده، تا حدودی کوچک‌تر از ماهی‌های کنترل بود. بنابر این می‌توان این طور استدلال نمود که نونیل فنل اتوکسیلات بر روی رشد ماهی‌ها نیز اثر دارد ولی میزان اثر این ماده بر وزن ماهی‌ها و تأثیر بر گنادوتروپین‌ها در این پژوهش مورد بررسی قرار نگرفت. در پژوهش حاضر بر اساس نتایج حاصل از تعیین محدوده (Range finding)، غلظت نونیل فنل اتوکسیلات، ۱۰ - ۱۰۰ µg / L میکروگرم در لیتر آب تعیین شد. در شکل (۱) نمودار مربوط به اثر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون ۱۷ بتا – استرادیول بر ماهی‌های با وزن کمتر از ۴ گرم نشان داده شده است. در این نمودار افزایش میزان ماده نونیل فنل اتوکسیلات در همه تیمارها موجب افزایش هورمون استرادیول شده است ولی میزان افزایش هورمون در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بیشتر از بقیه تیمارها بوده است. در شکل (۲) نمودار مربوط به اثر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون استرادیول در ماهی‌های با وزن ۵ – ۴ گرم نشان داده شده است. افزایش میزان هورمون استرادیول در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بیش از تیمار ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر بود. تیمار ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نسبت به همه تیمارها کاهش بیشتری از میزان هورمون استرادیول را نشان داد که حاکی از بازدارندگی این دوز از ماده نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان تولید هورمون استرادیول است. شکل (۳) مربوط به اثر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بر میزان هورمون استرادیول در ماهی‌های با وزن بیش از ۵ گرم می‌باشد، همه تیمارها نسبت به تیمارهای کنترل افزایش میزان هورمون استرادیول را نشان می‌دهند. این افزایش هورمون به ترتیب در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در لیتر بیشتر از تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر و در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر بیشتر از تیمار ۱۰ میکروگرم در لیتر می‌باشد که نشان دهنده این است که در تیمار ۱۰۰ میکروگرم نونیل فنل این افزایش بسیار قابل توجه و نسبت به گروه کنترل تا دو برابر بوده است. در پژوهش حاضر در ماهی‌های بالغ ماده نونیل فنل اتوکسیلات باعث افزایش تولید هورمون استرادیول می‌شود. بر اساس آزمایش‌های Yang و همکارانش (۲۰۰۸) افزایش در میزان هورمون استروئیدی ۱۷ بتا – استرادیول وابسته به طول مدت و دوز ماده نونیل فنل اتوکسیلات بود. در دوز ۱۰ میکروگرم در لیتر ماده نونیل فنل افزایش هورمون استرادیول در سرم خون ماهی بالغ دیده شد و در دوز ۱۰۰ میزان افزایش هورمون به وزن و بالغ بودن ماهی بستگی داشت. نونیل فنل بر ماهی‌های با وزن بیش از

۵ گرم اثر افزایشی بر هورمون استرادیول در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر را نشان داد ولی میزان این افزایش به اندازه گروه‌های وزنی پایین‌تر نبود. این احتمال وجود دارد که ماهی‌های با این وزن بیشتر نر بوده و میزان هورمون استرادیول کمتری در آنها وجود داشته است. در بررسی هیستولوژیک تخمدان در ماهی زبرا سیچلید همان طور که در شکل (۴) دیده می‌شود تغییراتی در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر، نسبت به سایر تیمارها مشاهده می‌گردد. در این تیمار بیشتر اووسیت‌های تخمدان در حال زرده سازی (ویتلوژنز) هستند. علت این موضوع می‌تواند اثر ماده نونیل فنل اتوکسیلات بر اووسیت ها و تحریک بیان ژن ویتلوژنین و افزایش زرده سازی و رشد بیشتر فولیکول‌های تخمدان باشد. ماده ۴– نونیل فنل، محصول تجاری نونیل فنل اتوکسیلات توسط موجودات زنده است و تحقیقات در مورد ماهی ماده قزل‌آلای رنگین کمان نابالغ توسط Ashfield و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که این ماده برروی رشد ماهی مؤثر است. طبق گزارش آنها ۴– نونیل فنل در غلظت‌های ۳۰ µg / L و ۱۰ در ماهی اثر بازدارنده رشد دارد. در این پژوهش، در مورد ماهی‌هایی که نسبت به دیگر ماهی‌ها اندازه کوچک‌تری داشتند، توقف رشد مشهودتر بود. به نظر می‌رسد که درباره ماهی‌های مورد آزمایش، در تحقیق حاضر، همین مساله روی داده باشد. در پژوهش حاضر، برای بررسی اثرات ماده نونیل فنل اتوکسیلات (NPEO) برماهی‌های *Cichlasoma nigrofasciatum* آن‌ها به مدت ۶۰ روز در معرض تراکم‌های NPEO ۱۰۰ µg /L و ۵۰، ۱۰ قرار گرفتند. با توجه به این که FSH باعث بلوغ اووسیت‌ها می‌شود (Tyler *et al*, 1997). با قرارگرفتن اووسیت‌ها در معرض نونیل فنل با غلظت‌های بالا احتمالاً تعداد کمی از آنها بالغ می‌شوند. علت آن می‌تواند کاهش استرادیول در پلاسما باشد. فولیکول‌های بالغ، تحت تأثیر FSH، E2 تولید می‌کنند (در پستانداران E2 بر روی FSH اثر فیدبکی منفی دارد). آن مقدار FSH که قبل از اثر نونیل فنل برای بالغ شدن فولیکول کافی بود، در صورت وجود نونیل فنل، از نمو فولیکول جلوگیری می‌کند (Zelenznik *et al*., 1985). به نظر می‌رسد که در مورد ماهی‌های مورد آزمایش، در تحقیق حاضر، همین مساله روی داده باشد.

اووسیت‌های نابالغ E2 تولید نمی‌کنند که می‌تواند توضیحی برای منع تولید E2 در معرض غلظت‌های بالای نونیل فنل باشد. نونیل فنل در کبد، یعنی جایی که ویتلوژنین سنتز می‌شود، بیش از هر جای دیگر، انباشته می‌شود. اگر ماهی‌ها در مراحل بحرانی نمو قرار داشته باشند، تراکم‌های حداکثری نونیل فنل، تولید مثل را در ماده‌ها دستخوش اختلال می‌کند و موجب افزایش تولید ویتلوژنین می‌شود اما این ویتلوژنین توسط اووسیت‌ها جذب نمی‌شود، و در نتیجه اووسیت‌ها نمو نمی‌یابند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تولید مثل به طور آشکار دچار اختلال شده است. از آنجایی که FSH واسطه نمو اووسیت است و همچنین جذب ویتلوژنین را به درون اووسیت‌های در حال نمو تحریک می‌کند، علت آن می‌تواند منع سنتز FSH در هیپوفیز و یا آزاد شدن آن به درون پلاسما تحت تأثیر نونیل فنل در غلظت‌های بالا باشد.

منابع

حسین زاده صحافی، ه. ۱۳۸۰. بیولوژی تولید مثل ماهی، با تأکید بر ماهی‌های ایران (۱). مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران.

یوسفیان، م. ۱۳۸۴. مقدمه‌ای بر آمار حیاتی و کاربرد آن در شیلات. انتشارات مؤسسه شیلات تهران. ایران.

Ahel, M., Giger, W. & Koch, M. 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 28: 1131-1142.

Ahel, M. & Giger, W. 1985. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography.

with ascorbic acid, on growth and stress resistance of angelfish, pterophylum scalare,juveniles. *Aquaculture International,* 10499-008-9192-8.

Pottinger, T. G. & Carrick, T. R. 2001. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in Rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, A: Molecular & Integrative Physiology*, 129: 399-404.

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

Tyler, C. R., Pottinger, T. G., Coward, K., Prat, F., Beresford, N. & Maddix, S. 1997. Salmonid follicle-stimulating hormone (GTH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction***,** 57: 1238-1244.

Wang, L. H., & Tsai, C. L. 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology***,** 286: 534– 537.

Yang, L., Lin, L., Weng., S., Feng, Z. & Luan,T.2008. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microsoms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2): 400-411.

Zeleznik, A. J., Hutchison, J. S. & Schuler, H.M. 1985. Interference with the gonadotropin-suppressing actions of estradiol in macaques overrides the selection of a single preovulatory follicle. *Endocrinology,* 117: 991-999.

Analytical Chemistry, 57: 1577-1583

Ahel, M., McEvoy, J. & Giger, W. 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environmental Pollution,* 79: 243-248

Ashfield, L. A., Pottinger, T. G. & Sumpter, J.P. 1998. Exposure of female juvenile Rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry***,** 17: 679-686.

Blackburn, M. A. & Waldock, M. J. 1995. Concentrations of alkyl phenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research,* 29: 1623-1629.

Cakmak, G., I. Togan & Severcan, F. 2006. 17β-Estradiol induced compositional, structural and functional changes in Rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol. *Aquatic Toxicology***,** 77: 53-63.

Goodbred, S. L., Gilliom, R. J., Gross, T. S., Denslow, N. P., Bryant, W. B. & Schoeb, T. R. 1997. Reconnaissance of 17- bestrabiol, 11- ketosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in Common carp of United States streams: potential for contaminent – induced endocrine disruption. United States Department of the Interior – US Geological Survey. Sacramento, CA, USA.

Lye, C. M., Frid, C. L. J., Gill, M. E., Cooper, O. W. & Jones, O. M. 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. *Environmental Science & Technology***,** 33: 1009-1014.

Norouzitalleb, P., Farhangi, M., Babapour, M., Rahimi, R., Sinha, A. K. & Baruh, K. 2008. Comparing the efficacy of dietary a-tocopherol with that of DL-α-tocopherol acetate, both either alone or in combination