نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۲، بهار ۱۳۹۳

اثر ۴–n–نونیل فنل بر سنتز ویتلوژنین و غلظت هورمون های تیروئیدی در جنس نر نابالغ ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*)

• **محمد نادری**
گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
• **علیرضا صفاهیه** (نویسنده مسئول)
گروه بیولوژی دریا، مرکز تحقیقات شیلات جنوب ایران، اهواز
• **سیمین دهقان مدیسه**
گروه بیولوژی دریا، مرکز تحقیقات شیلات جنوب ایران، اهواز
• **ابراهیم رجب زاده قطرمی**
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
• **حسین ذوالقرنین**
گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۹۱ تاریخ‌پذیرش: تیرماه ۱۳۹۲
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۶۸۳۳۱۸۲۱
Email: a.safahieh@kmsu.ac.ir

چکیده

نونیل فنل (NP) یک آلاینده استروژنیک بوده که با تقلید عملکرد هورمون طبیعی ۱۷بتا-استرادیول (E۲) موجب اختلال در سیستم اندوکرینی طیف وسیعی از موجودات می گردد. با این حال ایزومرهای مختلف این ماده توانایی های متفاوتی در بروز اثرات استروژنیک دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ایزومر NP با زنجیره جانبی مستقیم (۴- n-NP) برروی سنتز ویتلوژنین (VTG) و غلظت هورمون های تیروئیدی در ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) به عنوان پاسخ های استروژنیک و غیر استروژنیک سیستم اندوکرینی می باشد. بدین منظور تعداد ۳۰ قطعه ماهی شانک زردباله نر نابالغ در خلال یک هفته دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم از ۴- n-NP را از طریق تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. القاء سنتز VTG در ماهیان تیمار شده با استفاده از سنجش فسفات باز ناپایدار و اندازه گیری سطوح کلسیم توتال پلاسما مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پلاسمایی هومورن های تیروئیدی تیروکسین (T_4) و تری یدوتیرونین(T_3) نیز به وسیله رادیوایمونواسی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۴- n-NP موجب افزایش معنی دار سطح VTG در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم می گردد ($p<0/05$). همچنین غلظت کلسیم توتال پلاسما در بالاترین دوز به کار رفته افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<0/05$). علاوه براین، غلظت هورمون T_4 در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرگرم بر گرم بطور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P<0/05$). حال آنکه سطوح پلاسمایی T_3 در ماهیان تیمار شده با بالاترین دوز ۴- n-NP در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری پایین تر بود ($P<0/05$). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده توانایی ترکیب ۴- n-NP در ایجاد اثر استروژنیک و همچنین آشفتگی در تعادل هورمون های تیروئیدی ماهی شانک زردباله می باشد.

کلمات کلیدی: ۴-n-نونیل فنل، شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*)، ویتلوژنین، تیروکسین، تری یدوتیرونین، فسفات باز ناپایدار، اختلال اندوکرینی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 102 pp: 34-44

The effect of 4-n-nonylphenol on vitellogenin synthesis and thyroid hormone concentrations in immature male yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)

By: Naderi M. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Safahieh A. (Corresponding Author, Tel:989168331821) Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Dehghan Madiseh S. Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Rajabzade Ghatrami E. Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Zolgharnein H. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

Received: October 2012 **Accepted: August 2013**

Nonylphenol (NP) is a well-known compound as having the potential to mimic the natural hormone 17β-estradiol (E2) and disrupt the endocrine system in a wide range of organisms. However, the ability of different isomers of this compound is different in exerting estrogenic effects. The objectives of this study were to estimate the effects of a straight side-chain NP isomer (4-n-NP) on the vitellogenin (VTG) synthesis and thyroid hormone concentrations as estrogenic and non-estrogenic responses of yellowfin seabream's (Acanthopagrus latus) endocrine system. In this regard the total numbers of 30 immature male fish were intraperitonealy injectioned by 10, 50, 100 µg/g of 4-n-NP over a period of one week. The induction of VTG synthesis in treated fish was investigated using alkali labile phosphate assay and measurement of total plasma calcium. The concentrations of thyroid hormones, thyroxin (T4) and triiodothyronine (T3), in the plasma were also quantified by radioimmunoassay. The result showed that the VTG levels in the plasma were significantly increased by injection of 50 and and 100 µg/g of 4-n-NP ($P<0.05$). Moreover, the total plasma calcium concentrations in fish exposed to the highest dose used exhibited a significant increase compared to the control ($P<0.05$). In addition, T4 concentration in fish received 50 and 100 µg/g of 4-n-NP was significantly higher than the control group ($P<0.05$). While, the plasma levels of T3 in fish treated by 100 µg/g of 4-n-NP was significantly lower than controls ($P<0.05$). The results of present study indicate the potential of 4-n-NP to exert the estrogenic effect as well as disturbance in the balance of thyroid hormones in yellowfin seabream.

Key words: 4-n-Nonylphenol, Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*), Vitellogenin, Thyroxin, Triiodothyronine, Alkali labile phosphate, Endocrine disruption

مقدمه

در خلال سال های گذشته، نگرانی ها درباره ترکیباتی که قادرند از طریق ایجاد اختلال در سیستم اندوکرینی سلامت انسان و حیوانات را تحت تاثیر قرار دهند رو به افزایش بوده است (Mc-Cormick و همکاران , ۲۰۰۵ Goksøyr, ۲۰۰۶). ترکیبات مختل کننده اندوکرینی[1] (EDCs) شامل طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی طبیعی و مصنوعی می باشند (Tapiero و همکاران, ۲۰۰۲; Goksøyr, ۲۰۰۶). امروزه نقش این قبیل مواد در ایجاد اختلالات گوناگون و انواع مختلفی از سرطان ها در انسان و حیوانات تایید شده است (Segner, ۲۰۰۵; Gross-Sorokin و همکاران, ۲۰۰۶).

نونیل فنل (NP)، یکی از شناخته شده ترین EDC ها بوده که به علت حجم بالای تولید، پراکندگی گسترده در محیط زیست و ایجاد اثرات استروژنیک در موجودات گوناگون توجه عمومی را به سوی خود معطوف ساخته است (Norris و Carr, ۲۰۰۶). NP به واسطه تجزیه گروهی از سورفاکتانت های غیریونی، به نام آلکیل فنل اتوکسیلات ها[2] در محیط های آبی تشکیل گردیده و اثبات شده است که نسبت به ترکیبات سازنده خود از پایداری و سمیت بالاتری برخوردار می باشد (Soares و همکاران , ۲۰۰۸). این مواد که بطور گسترده ای در تولید دترجنت ها، آفت کش ها، امولسیون کننده ها، رزین های فنلی و انواع مختلفی از پلاستیک ها مورد استفاده قرار می گیرند، از طریق فاضلاب و بصورت پیوسته وارد محیط زیست می گردند (Soares و همکاران, ۲۰۰۸; Montgomery-Brown و Reinhard, ۲۰۰۳).

در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که NP از طریق اتصال به گیرنده های استروژنی[3] (ERs) و فعال سازی آنها، قادر

بـه تقلید اثر هورمون طبیعی ۱۷بتا-اسـترادیول (E۲) می باشـد (Tollefsen و همکاران ۲۰۰۸، Soto و همکاران ۱۹۹۵, Olsen و همکاران.، ۲۰۰۵). این هورمون مسـئول رشد و ابقاء صفات جنسی و همچنین رسـیدگی و عملکرد اندام های جنسـی ماده می باشد (Vetillard و Bailhache , ۲۰۰۶; Etgen و Pfaff ,۲۰۰۹). از این رو انتظار می رود تقلید عملکرد E۲ توسـط NP موجب بروز پاسـخ های گوناگون در موجودات گردد. مطالعات متعددی نشـان داده که ایـن ترکیب موجب تحریک سـنتز ویتلوژنین[۴] (VTG)، پیش ماده پروتئین های زرده، در محیط های طبیعی و کشت سلولی هپاتوسیت های ماهیان نر و نابالغ می شود (Kinnberg و همکاران, ۲۰۰۰ ; Lin و Janz ، ۲۰۰۶; Zha و همـکاران ۲۰۰۳ ; Tollef-sen و همکاران ، ۲۰۰۷; Schoenfuss و همکاران , ۲۰۰۴). تولید VTG در کبـد جنس ماده مهـره داران، از جمله ماهیان فرآیندی معمول اسـت. با این وجود سـطوح این گلیکولیپوفسفوپروتئین در پلاسـمای جانوران نر و نابالـغ پایین بوده و یا غیر قابل سـنجش می باشـد (Wheeler و همکاران, ۲۰۰۵). از طرفی نرها و نابالغ ها نیـز (همانند ماده ها) دارای ER هـای کبدی بوده و قرار گیری در معرض ترکیبات زنواسـتروژن[۵] منجر به سنتز این پروتئین در آنها می گردد (Kime و همکاران , ۱۹۹۹). این موضوع موجب شده که تولید VTG توسـط نرها و نابالغین به عنوان یک نشانگر زیستی از مواجهه با ترکیبات زنواسـتروژن در نظر گرفته شـود (Wheeler و همکاران, ۲۰۰۵).

در حقیقت NP متشـکل از ایزومرهای مختلفی اسـت که به دلیل تفاوت در سـاختار مولکولی توانایی استروژنیک گوناگونی را از خود نشـان می دهند. اکثر اختلالات اندوکرینی گزارش شـده در مورد NP، عمدتـاً مربوط به فـرم ایزومری شـاخه دار آن یعنی ۴-NP می باشـد. در حالیکه ایزومرهای خطی NP (۴-n-NP)خصوصیات فیزیکوشـیمیایی بسـیار متفاوتی داشـته و قابلیت آنهـا در ایجاد اختلالات اندوکرینی با ایزومرهای شاخه دار متفاوت است (Preuss و همـکاران, ۲۰۰۶). در یک مطالعه مقایسـه ای برروی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داده شده است که تنها ایزومر شـاخه دار NP قادر به القاء سـنتز VTG در این ماهی اسـت حال آنکه ایزومر خطی آن چنین توانایـی را ندارد (Peder-sen و همـکاران ، ۱۹۹۹). در مقابل، بررسـی هـای دیگر حاکی از توانایی ۴-n-NP در القاء تولید کبدی VTG در قزل آلای جنس نر بوده اسـت (Jobling و همکاران.، ۱۹۹۶ Xie و همکاران.، ۲۰۰۵; Vetillard و Bailhache ، ۲۰۰۶; Bonefeld-Jørgensen و همکاران، ۲۰۰۷). از سـوی دیگر اختلالات ناشی از NP ها تنها به القاء سـنتز VTG محدود نمی گردد. از دیگر اثرات مضر مشـاهده شـده این ترکیبات (عمدتاً ۴-NP) در ماهیان می توان به اثر برروی بیضه هـا (Kinnberg و همکاران، ۲۰۰۰)، تخمدان ها (Ashfield و همکاران، ۱۹۹۸)، لقاح و باروری (Ishibashi و همکاران، ۲۰۰۶)، تحرکت اسـپرم (Kawana و همکاران.، ۲۰۰۳) و همچنین غلظت هورمون های جنسـی (Yang و همکاران.، ۲۰۰۸) اشاره کرد. علاوه بر این، اخیراً اثبات شده اسـت که تیروئید نیز در پاره ای از ماهیان می تواند به عنوان یک اندام هدف تحت تاثیر این زنواسـتروژن قرار بگیـرد (Zaccaroni و همـکاران.، ۲۰۰۹; Sciarrillo و همکاران، ۲۰۱۰).

تاکنـون مطالعـه ای در ارتباط بـا تاثیـر ۴- n-NP بر غلظت هورمون های تیروئیدی در بدن موجود زنده انجام نگرفته اسـت. با ایـن حال اعمال این ترکیب به دودمان سـلولی[۶] تومور هیپوفیزی GH۳ مـوش صحرایـی، منجر بـه تحریک رشـد آن و همچنین بازدارندگی فعالیت آنزیم تیروئید پروکسیداز[۷] (TPO) گردید. آنزیم اخیر مسـئول کاتالیز کردن فرآیند ید دار شدن تیروزین و تشکیل هورمون تیروکسین[۸] ($T_۴$) به واسطه جفت شدن ۲ دی یدوتیروزین[۹] (DIT) می باشد (Ghisari و Bonefeld-Jorgensen, ۲۰۰۵).

ماهی شـانک زردباله از گونه های غالب آب های جنوبی کشور به ویژه منطقه خور موسـی بوده و در سـالهای اخیـر پرورش آن در این آبها در حال گسـترش بوده اسـت. ماهـی مذکور یک گونه هرمافرودیت پروتاندر از خانواده شـانک ماهیان (Sparidae) است (Hesp و همکاران.، ۲۰۰۴). وجود مرحله حسـاس تمایز جنسـی در ماهی شـانک زردبالـه می تواند این گونه را بطـور بالقوه ای در معرض اختلالات اندوکرینی ناشـی از EDC ها قرار دهد. از طرفی آب های خور موسـی به دلیل احاطه شـدن توسـط منابع متعدد آلودگی از قبیل صنایع پتروشیمی، بنادر کشتیرانی، تاسیسات نفتی، مناطق مسکونی و غیره بطور گسترده ای در معرض طیف وسیعی از آلاینده ها به ویژه EDC ها قرار دارد. هدف از تحقیق حاضر مطالعه تاثیر ۴- n-NP بر روی سنتز VTG و غلظت هورمون های تیروئیدی در ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) می باشد.

مواد و روش ها

صید ماهی و دوره سازگاری

جهت انجام مطالعه حاضر تعداد ۳۰ عدد ماهی شانک زردباله نر نابالـغ (با میانگین وزنی ۳/۴۸±۱۷۹/۳۶ گرم) از خور زنگی (یکی از انشـعابات خور موسی در بندر ماهشهر) صید شد. ماهیان بطور زنده به ایسـتگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امـام خمینی (ره) واقع در شهرستان ماهشـهر، منتقل شدند. پس از ثبت طول و وزن کل، ماهیان در ۴ تانک حاوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه UV (شـوری ۰ درصد ۴۵، دما ۲۶ درجه سانتی گراد، pH =۸/۱) توزیع گشـتند. ماهیان به مدت ۱۰ روز با شـرایط آزمایش سازگاری داده شـدند. در طول دوره آزمایش از میگو بـرای غذا دهی ماهیان و به میزان ۲ درصد وزن بدن استفاده شد.

به منظور مواجهه ماهی شانک زردباله با دوزهای مختلف ۴- n-NP از روش تزریق درون صفاقی اسـتفاده شـد (Ostrander, ۲۰۰۵). دوزهای مختلـف از ۴- n-NP (Alfa Asar ۹۸ + ٪ , USA) با حل کردن مقدار مورد نظر از این ماده در اتانول و رقیق کردن آن با روغن نارگیل تهیه گردید (Hill, ۲۰۰۰). ماهیان به وسـیله سرنگ انسـولین و در خلال ۷ روز با دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر

گرم وزن بدن از n-NP- ۴ تحت تزریق قرار گرفتند (Christensen و همکاران, ۱۹۹۹). دوز مورد نظر در دو نوبت به فاصله زمانی ۳ روز و هر بار به میزان ۵۰ درصد به ماهیان تزریق شد. گروهی از ماهیان نیز به عنوان گروه شاهد تنها با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روغن نارگیل- اتانول تیمار شدند.

در پایان دوره آزمایش؛ پس از خارج کردن ماهیان از تانک ها آنها را به وسیله ۲-فنوکسی اتانول ۰/۱ درصد (Merck, Germany) بیهوش کرده و پس از ثبت طول و وزن کل، از ورید ساقه دمی آنها خونگیری به عمل آمد. نمونه های خون به سرعت به لوله های سرد شده با یخ منتقل گشته و سپس به منظور جداسازی پلاسما با دور g× ۱۰۰۰ در ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. نمونه های پلاسما سپس با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال یافته و تا انجام آنالیزها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سنجش VTG

برای اندازه گیری VTG در مطالعه حاضر از دو روش اختصاصی (روش فسفات باز ناپایدار[10] (ALP) و غیر اختصاصی (سنجش کلسیم توتال پلاسما) استفاده شد.

جهت بررسی القاء سنتز VTG از طریق ALP، روش توصیف شده به وسیله Hallgren و همکاران (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسما با ۵۴ میکرولیتر استون مخلوط گشته و در دور g× ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس با دو شستشوی پیاپی توسط Tris و اتانول، فسفات های آزاد پلاسما جداسازی شدند. پلت های پروتئین جدا شده توسط ۱۰۰ میکرولیتر از NaOH ۱ مولار تیمار شده و در بن ماری (در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شدند. سرانجام با ایجاد کمپلکس آمونیوم فسفومولیبدات و احیاء آن توسط اسکوربیک اسید، رنگ آبی ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/ ۵۲۰ Beckman DU VIS, USA) قرائت گردید که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت VTG در پلاسما در نظر گرفته شد (Hallgren و همکاران., ۲۰۰۹).

اندازه گیری سطوح کلسیم توتال پلاسما به عنوان اندیکاتور غیر مستقیم وجود VTG در پلاسما، از طریق رنگ سنجی و با استفاده از کیت تجاری زیست شیمی (۵۰۶ -۱۰ REF، ساخت ایران) به روش ارتوکرزول فتالئین و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

سنجش هورمون های تیروئیدی

اندازه گیری سطوح هورمون های تری یدوتیرونین[11] (T۳) و تیروکسین (۴ نمونه در هر تیمار) به روش رادیوایمونواسی[12] (RIA) و با استفاده از کیت تجاری Immunotech I^{125} RIA (kit, France) انجام پذیرفت. براساس دستورالعمل سازنده، ۲۵ میکرولیتر از نمونه پلاسما یا استاندارد با ۲۰۰ میکرولیتر از T_3 یا T_4 نشان دار به تیوب های پوشانده شده از آنتی بادی اضافه شده و به مدت ۱ ساعت برروی شیکر و در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس محتوی تیوب ها خالی شده و میزان تشعشعات گامای آنها در دستگاه شمارنده ی گاما (Finland ,LKB۲) اندازه گیری شد. میانگین میزان بازیابی[13] سنجش هورمون ها برای هورمون های T_3 و T_4 به ترتیب ۳ ± ۹۱ درصد و ۴ ± ۹۳ درصد بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده ها بصورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده است. نرمالیته داده ها به وسیله آزمون Shapiro-Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس جهت بررسی معنی داری اختلاف میان تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و پس آزمون دانکن در سطح معنی دار ۹۵ درصد استفاده شد.

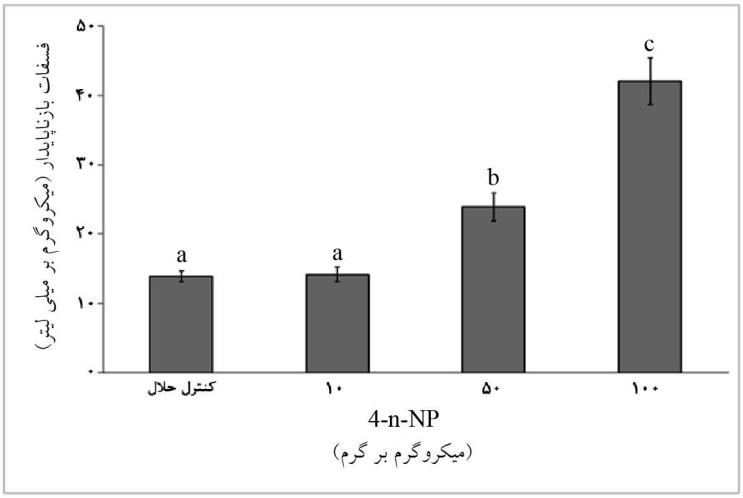
نتایج

نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت VTG با روش ALP در پلاسمای ماهی شانک زردباله نشان داد که بین سطوح این پروتئین در میان تیمار های مختلف تفاوت معنی داری وجود دارد ($P <$ ۰/۰۵). به گونه ای که بین افزایش دوز n-NP- ۴ و میزان ALP پلاسما رابطه مستقیم معنی داری وجود داشت (R^2=۰/۹۷). سطوح VTG در ماهیان تیمار شده با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم از n-NP- ۴ پس از گذشت یک هفته افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. با این حال سطوح پلاسمایی این پروتئین در ماهیان دریافت کننده کمترین دوز n-NP- ۴تغییرات معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($P <$ ۰/۰۵ ، شکل ۱). اندازه گیری مقادیر کلسیم توتال پلاسما نیز نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین گروه های تیمار شده و گروه کنترل بود ($P <$ ۰/۰۵). هرچند این تفاوت معنی دار تنها در ماهیان تزریق شده با بالاترین دوز n-NP- ۴ (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. غلظت کلسیم توتال پلاسما در ماهیان تیمار شده با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم، تغییرات معنی داری را نسبت به ماهیان کنترل نداشت ($P <$ ۰/۰۵، شکل ۲).

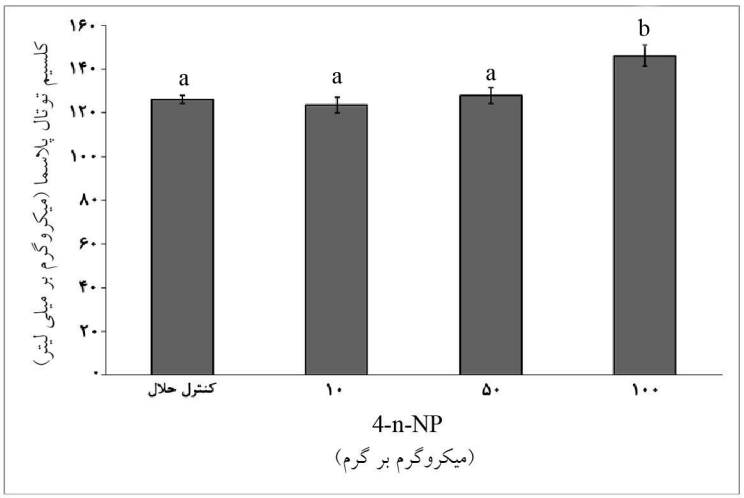
نتایج نشان داد که میزان هورمون T_3 در ماهی شانک زردباله در طی مواجهه با n-NP- ۴ بطور معنی داری کاهش می یابد ($P <$ ۰/۰۵). اما این کاهش تنها در گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ میکروگرم بر گرم از n-NP- ۴ معنی دار بود ($P <$ ۰/۰۵، شکل ۳-الف). از سوی دیگر، تیمار ماهی شانک زردباله با دوز های مختلف از n-NP- ۴ به مدت ۷ روز منجر به یک افزایش وابسته به دوز معنی دار در سطوح T_4 پلاسما شد ($P <$ ۰/۰۵ ، شکل ۳-ب). در مقایسه با گروه کنترل، این افزایش در ماهیان دریافت کننده دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم مشاهده گردید. ولی غلظت T_4 در گروه دریافت کننده دوز ۱۰ میکروگرم بر گرم همچنان بدون تغییر باقی ماند ($P <$ ۰/۰۵).

بحث

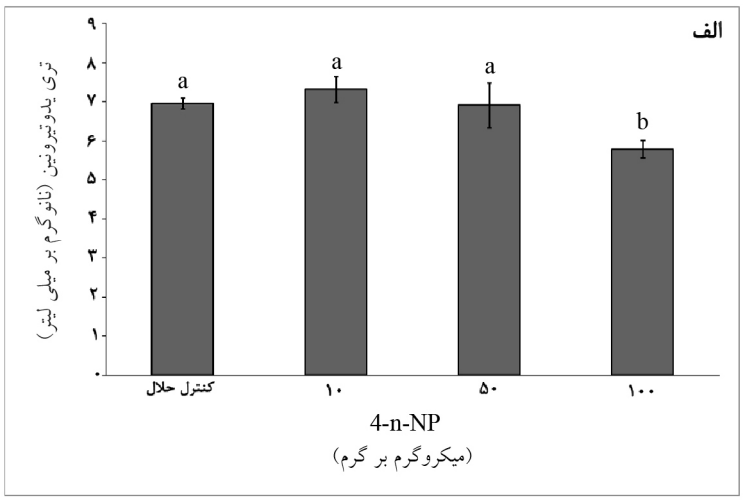
نتایج مطالعه حاضر بصورت آشکاری نشان داد که n-NP- ۴ قادر به تحریک سنتز VTG در ماهی شانک زردباله نابالغ می باشد.

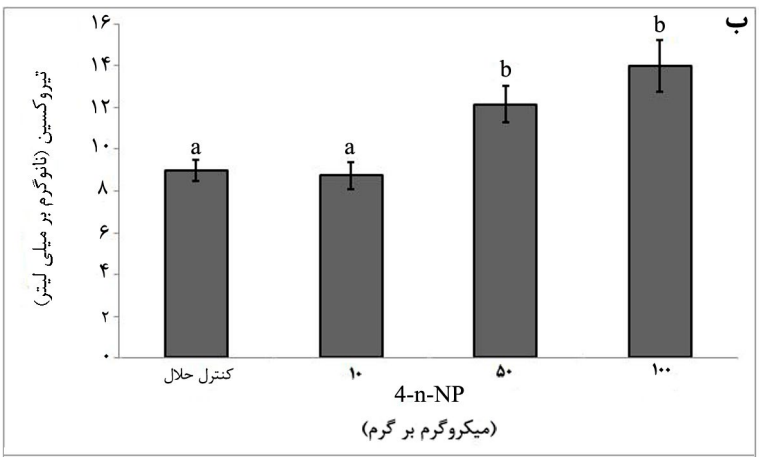


شکل ۱- اثر ۴-n-NP برروی غلظت ALP پلاسما در ماهی شانک زردباله پس از گذشت ۷ روز (n=۶).
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در میان گروه های آزمایشی می باشد (P <۰/۰۵).



شکل ۲- اثر ۴-n-NPبرروی سطوح کلسیم توتال پلاسما در ماهی شانک زردباله پس از گذشت ۷ روز (n=۶). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در میان گروه های آزمایشی می باشد (P <۰/۰۵).





شکل ۳- غلظت هورمون های تیروئیدی (الف) تری یدوتیرونین و (ب) تیروکسین در ماهی شانک زردباله تیمار شده با 4-n-NP پس از گذشت ۷ روز (n=۴). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در میان گروه های آزمایشی می باشد (P <۰/۰۵).

پیش از این بررسی های مختلفی نشان داده بودند که تولید کبدی VTG می تواند یک نشانگر زیستی حساس برای مواجهه با ترکیبات استروژنیک از قبیل NP باشد. با این وجود بیشتر گزارشات منتشر شده در ارتباط با ترکیب NP- ۴ بوده است. بطور مثال، Pait و Nelson(۲۰۰۳) القاء ویتلوژنز را در جنس نر کیلی فیش (*Fundulus heteroclitus*) به واسطه تزریق درون صفاقی NP- ۴ مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند که این ترکیب قادر به تحریک سنتز VTG در گونه مزبور می باشد. همچنین مواجهه آبی ماهی آزاد آتلانتیکی (*Salmo salar*) با NP منجر به یک افزایش معنی دار وابسته به دوز و زمان در سطوح پلاسمایی VTG شد (Meucci و Arukwe ۲۰۰۵). به همین صورت Li و Wang (۲۰۰۵) پس از قرار دهی گوپی های نر بالغ (*Poecilia reticulata*) در معرض دوزهای مختلف NP- ۴، شاهد افزایش معنی دار سطوح VTG در پلاسمای این ماهی نسبت به گروه کنترل بودند. علاوه بر این ۲۱ روز در معرض قرارگیری با دوزهای مختلف NP- ۴ موجب افزایش معنی دار سطوح VTG در پلاسمای ماهی *Gobiocypris rarus* شده است (Zha و همکاران., ۲۰۰۷). علیرغم گزارشات فوق که همگی حاکی از اثر استروژنیک NP- ۴ در تحریک سنتز VTG می باشند، معدود مطالعات انجام شده در ارتباط با ۴-n-NP نتایج متفاوتی را نشان می دهد. به عنوان مثال تزریق درون صفاقی دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم از ۴-n-NP اثر معنی داری برروی سطوح VTG در ماهی قزل آلای رنگین کمان نابالغ (*O. mykiss*) نداشت (Ashfield و همکاران., ۱۹۹۸). حال آنکه نتایج مطالعه Maradonna و همکاران (۲۰۰۴) نشان دهنده تحریک سنتز VTG در گاو ماهی سیاه جنس نر (*Gobius niger*) پس از در معرض قرار گیری آبی با این ماده بود. تیمار ماهی قزل آلای رنگین کمان نابالغ (*O. mykiss*) با دوزهای مختلف از ۴ -n-NP نیز موجب افزایش معنی دار بیان ژن VTG و ER های کبدی گردید (Vetillard و Bailhache, ۲۰۰۶). بطور مشابهی، افزایش معنی دار سطوح ALP پلاسما در مطالعه حاضر نیز مبین سنتز کبدی VTG در ماهی شانک زردباله تمیار شده با ترکیب ۴-n-NP بود.

تفاوت در عملکرد زنواستروژن ۴-n-NP احتمالا در ارتباط با عوامل گوناگونی از جمله تفاوت در ساختار فیزیکوشیمایی آن نسبت به ایزومر شاخه دار NP- ۴ و همچنین پتانسیل ER های کبدی در بین گونه های مختلف جهت اتصال به لیگاند استروژنی باشد. Shioji و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند که یک ویژگی مهم ساختاری آلکیل فنل ها در بروز اثر استروژنیک، بزرگی و حجیم بودن زنجیره آلکیلی آنهاست (Shioji و همکاران, ۲۰۰۶). همچنین Preuss و همکاران (۲۰۰۶) اظهار نمودند که با وجود قابلیت ۴-n-NP در اعمال اثر استروژنیک در محیط کشت سلولی سلول های۷- MCF سرطان پستان انسان، توانایی این ترکیب نسبت به ایزومرهای شاخه دار مشابه بسیار کمتر می باشد. این محققین علاوه بر تایید نتیجه مطالعه قبلی، اندازه زنجیره جانبی قرار گرفته در موقعیت کربن-آلفا (برروی زنجیره آلکیلی مرکزی) را یکی دیگر از ویژگی های مهم ایزومرهای NP- ۴در بروز اثر استروژنیک توصیف نمودند (Pre-uss و همکاران ., ۲۰۰۶). در مطالعه دیگری با استفاده از کشت سلولی هپاتوسیت های قزل آلای رنگین کمان (*O. mykiss*)، نشان داده شد که هر دو فرم ایزومری آلکیل فنل ها قادر به القاء سنتز VTG می باشند، با این حال توانایی ایزومرهای دارای زنجیره جانبی شاخه دار همانند NP- ۴، ۳ تا ۱۰ برابر بیشتر از فرم خطی آنها می باشد (Tollefsen و همکاران., ۲۰۰۸).

توانایی ER یک گونه برای ایجاد کمپلکس با لیگاندهای NP نیز می تواند عامل مهم دیگری در بروز و شدت پاسخ استروژنیک به این ترکیب باشد (Tollefsen و همکاران, ۲۰۰۸; Jung و همکاران, ۲۰۰۶). این توانایی در گونه های مختلف متفاوت می باشد، به گونه ای که در معرض قراردهی ماهی گورخری (*Danio rerio*) و قزل آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) با دوزهای مشابه از NP- ۴ موجب پاسخ ویتلوژنیک متفاوت در آنها شد (Van den Belt و همکاران., ۲۰۰۳). این اختلاف حتی در یک گونه و بین جنس های نر، ماده و ماهیان نابالغ نیز گزارش شده است (Jung و همکاران., ۲۰۰۶). بنابراین احتمال دارد تفاوت در نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر سنتز VTG در شانک زردباله با آنچه برای قزل آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) گزارش شده بود (Pedersen و همکاران., ۱۹۹۹; Andersen و همکاران., ۱۹۹۹) به علت توانایی بالای ER های کبدی این گونه در تشکیل کمپلکس با لیگاند ۴-n-NP و متعاقباً فعال سازی ژن های پاسخ دهنده به استروژن باشد. بدیهی است که نوع در معرض قرار دهی و میزان دوز به کار رفته نیز در این زمینه می تواند تاثیر گذار باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان کلسیم توتال پلاسما با افزایش دوز ۴-n-NP بیشتر می گردد. VTG یک پروتئین غنی از کلسیم بوده و غلظت های کلسیم توتال پلاسما همبستگی مستقیمی با سطوح این پروتئین دارد (Goksøyr, ۲۰۰۶). لذا به منظور ارزیابی کامل سطوح VTG پلاسما می توان از سنجش مقادیر کلسیم استفاده نمود (Verslycke و همکاران., ۲۰۰۲; Gil-lespie و de Peyster، ۲۰۰۴). مطالعات گذشته نشان داده است که به دنبال تحریک استروژنی (E2) تولید VTG و همچنین غلظت کلسیم توتال پلاسما بطور همزمان افزایش می یابد (Mandiki و همکاران., ۲۰۰۵; Gillespie و de Peyster, ۲۰۰۴). همچنین McCormick و همکاران (۲۰۰۵) افزایش سطوح کلسیم توتال پلاسما را هم راستا با القا VTG در پلاسمای ماهی آزاد آتلانتیکی نابالغ (*S.salar*) به دنبال تزریق درون صفاقی NP- ۴ و E2 مشاهده نمودند (McCormick و همکاران., ۲۰۰۵). از اینرو گمان می رود تغییر در سطوح کلسیمی پلاسمای ماهی شانک زردباله احتمالاً منسوب به افزایش غلظت VTG در پاسخ به ترکیب ۴-n-NP بود.

گرچه مطالعات معدودی در رابطه با تاثیر NP- ۴ برروی هموستازی هورمون های تیروئیدی صورت پذیرفته است. با این وجود اطلاعاتی از اثر فرم خطی آن در محیط طبیعی در دست نیست. علاوه بر اثر استروژنیک مشاهده شده به وسیله ۴-n-NP،

نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده ایجاد اختلال این ترکیب در تعادل هورمون های تیروئیدی بود. این اختلال می تواند در چندین مرحله، از جمله سنتز، تنظیم، متابولیسم و عمل هورمون های تیروئیدی رخ دهد.

۱۴ روز در معرض قرار گیری ماهی آزاد آتلانتیکی (*S. salar*) با دوزهای مختلف از 4-NP و E2 منجر به کاهش معنی دار سطوح هورمون های تیروئیدی (T_3 و T_4) در این گونه شد (McCormick و همکاران, ۲۰۰۵). علاوه بر این تغییرات سطوح T_4 حساسیت بیشتری نسبت به اثر 4-NP در مقایسه با T_3 نشان داد. Zaccaroni و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی اثر 4-NP بر سطح هورمون های تیروئیدی ماهی قرمز نر بالغ (*Carassius auratus*) مشاهده نمودند که سطوح هورمون T_4 بصورت معنی داری پس از گذشت ۲۸ روز کاهش یافت، اما غلظت T_3 بدون تغییر باقی ماند. در بررسی دیگری که برروی جنس نر بالغ سوسمار (*Podarcis sicula*) انجام شد، تزریق درون صفاقی 4-NP منجر به کاهش معنی دار سطوح پلاسمایی T_3 و T_4 (بطور بارزتر) گردید (Sciarrillo و همکاران.، ۲۰۱۰). در مقابل، در معرض قرار دهی تغذیه ای ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) با4-NP تغییرات معنی داری را در سطوح پلاسمایی T_3 و T_4 این ماهی ایجاد نکرد (Keen و همکاران., ۲۰۰۵).

نتایج مطالعه حاضر تا حدودی متفاوت از گزارشات پیشین می باشد. همانگونه که شکل ۳-الف نشان می دهد، تزریق 4-n-NP در خلال ۷ روز منجر به کاهش معنی دار سطوح T_3 نسبت به گروه کنترل شد، در مقابل یک روند معکوس برای سطوح T_4 پلاسمای ماهیان با افزایش دوز مشاهده گردید (شکل ۳-ب). تنها اطلاعات در دست درباره تاثیر 4-n-NP بروی تیروئید مطالعه Ghisari و Bonefeld-Jorgensen, (۲۰۰۵) می باشد که برروی سلول های GH۳ موش انجام پذیرفت و نشان داده شد که 4-n-NP موجب توقف فعالیت TPO می گردد. یک روند معکوس در گربه ماهی آب شیرین (*Clarias batrachus*) تیمار شده با اندوسولفان مشاهده شد، بطوریکه این ماده موجب افزایش فعالیت آنزیم TPO و کاهش حذف T_4 گردید. متعاقبا سطوح پلاسمایی T_4 بصورت معنی داری افزایش و در مقابل، سطوح T_3 کاهش یافت (Sinha و همکاران.، ۱۹۹۱). همچنین Lima و همکاران (۲۰۰۶) یک افزایش قابل توجه را در فعالیت TPO در موش های سالم و تخمدان برداشته که با E2 تیمار شده بودند، گزارش نمودند. از اینرو به نظر می رسد که افزایش فعالیت TPO در مواجهه ماهی شانک با 4-n-NP می تواند یک دلیل احتمالی برای افزایش سطوح هورمون T۴ در مطالعه حاضر باشد.

بخش عمده T_3 در خون به وسیله حذف یک اتم ید از حلقه فنلی بیرونی T_4 تولید می شود و این عمل به وسیله یک آنزیم یدزدا [۱۴] به نام monodeiodinase ۵'- (MDA-۵') کاتالیز می گردد (Brown و همکاران.، ۲۰۰۴; Di Giulio and Hinton, ۲۰۰۸). از اینرو با اختلال یا کاهش فعالیت در عملکرد این آنزیم میزان تبدیل T_4 به T_3 کاهش می یابد. پیش از این نشان داده شده بود که E2 قادر است فعالیت MDA-۵' را در قزل آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) کاهش دهد (Flett و Leatherland, ۱۹۸۹). بنابراین گمان می رود که 4-n-NP در یک روند مشابه با ایجاد اختلال در فعالیت MDA-۵' موجب کاهش فرآیند تبدیل T_4 به T_3 گردد. به علاوه کاهش تولید T_3 و حذف آنزیمی آن به مرور زمان (Norris و Carr, ۲۰۰۶) می تواند عامل احتمالی عمده در کاهش غلظت این هورمون در ماهیان تیمار شده باشد.

نتیجه گیری

بطور کلی یافته های این تحقیق نشان دهنده سنتز VTG و بر هم خوردن تعادل هورمون های تیروئیدی T_3 و T_4 به عنوان پاسخ های استروژنیک و غیر استروژنیک سیستم اندوکرینی ماهی شانک زردباله در مواجهه با 4-n-NP بود. از آنجاییکه ماده مذکور جزء ترکیبات زنوبیوتیک[۱۵] با توانایی استروژنیک پایین به شمار می آید، واکنش سریع ماهی شانک به آن در نوع خود قابل توجه می باشد. علاوه براین، افزایش سطوح VTG می تواند به عنوان علامت هشداری از اختلالات تولید مثلی به شمار آید. هورمون های تیروئیدی نیز در فرآیند های مهمی از قبیل رشد اولیه جنینی، متابولسیم، تولید مثل، دگردیسی و تنظیم اسمزی ماهیان ایفای نقش می کنند. لذا آشفتگی در سطوح این هورمون ها می تواند اثرات سوئی را به دنبال داشته باشد.

پاورقی ها

1- Endocrine disrupter chemicals
2- Alkylphenol ethoxylates
3- Estrogen receptors
4- Vitellogenin
5- Xenoestrogen
6- Cell line
7- Thyroid peroxidase
8- Thyroxin
9- Diiodotyrosine
10- Alkali labile phosphate
11- Triiodothyronine
12- Radioimmunoassay
13- Recovery rate
14- Deiodinating enzyme
15- Xenobiotic

منابع مورد استفاده

1-Andersen, H. R., Andersson, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., et al. (1999) Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 107(Suppl 1): 89-108

2- 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(4): 679-686.

3- Bonefeld-Jørgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V., Vinggaard, A. M. (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*. 115(S-1): 69-76.

4- Brown, S. B., Adams, B. A., Cyr, D. G., Eales, J. G. (2004) Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(7): 1680-1701.

5- Christensen, Lene J, Bodil Korsgaard, and Poul Bjerregaard. 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *(Platichthys flesus*). *Aquatic toxicology*. 46 (3):211-219.

6- Di Giulio, R. T., Hinton, D. E. (2008) *The Toxicology of Fishes.* CRC Taylor and Francis, New York. pp: 476-477.

7- Etgen, A.M.; Pfaff, D.W. (2009) *Molecular Mechanisms of Hormone Actions on Behavior.* Academic Press, San Diego. pp: 1100.

8- Flett, PA.; Leatherland, J.F. (1989) Dose-related effects of 17β-estradiol (Ea) on liver weight, plasma Ea, protein, calcium, and measurement of the binding of thyroid hormones to vitellogenin in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*. 34, 515-27.

9- Ghisari, M., Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2005) Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 244(1-2): 31-41.

10- Gillespie, D. K., de Peyster, A. (2004) Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58(1): 90-95.

11- Goksøyr, A. (2006) Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A. 69(1-2): 175-184.

12- Gross-Sorokin, M. Y., Roast, S. D., Brighty, G. C. (2006) Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales. *Environmental Health Perspectives*. 114(S-1): 147-151

13- Hallgren, P., Martensson, L., Mathiasson, L., Mårtensson, 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(14): 1023-1042.

14- Hesp, A. S., Potter, I. C., Hall, N. G. (2004) Reproductive biology and protandrous hermaphroditism in *Acanthopagrus latus. Environmental Biology of Fishes.* 70(3): 257-272.

15- Hill, K. (2000) Fats and oils as oleochemical raw materials. *Pure and Applied Chemistry.* 72, 1255-1264.

16- Ishibashi, H., Hirano, M., Matsumura, N., Watanabe, N., Takao, Y., Arizono, K. (2006) Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 65(6): 1019-1026.

17- Jobling, S., Sumpter, J. P., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15(2) 194-202.

18- Jung, J. H., Shim, W. J., Addison, R., Baek, J. M., Han, C. H. (2006) Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish (*Sebastes schlegeli*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology and Pharmacology.* 143(2): 162-170.

19- Kawana, R., Strüssmann, C., Hashimoto, S. (2003) Effect of p-Nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 28(1): 213-214.

20- Keen, P. L., Higgs, D. A., Hall, K. J., Ikonomou, M. (2005) Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Science of the Total Environment.* 349(1-3): 81-94.

21- Kime, D., Nash, J., Scott, A. (1999) Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*. 177(1-4): 345-352.

22- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A. (2000). Effects of nonylphenol and 17β-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus. Journal of Experimental Biology.* 203(2): 171-181.

23- Li, M. H., Wang, Z. R. (2005). Effect of nonylphenol on plasma vitellogenin of male adult guppies (*Poecilia reticulata*). *Environmental Toxicology.* 20(1): 53-59.

24- Lin L.L. , Janz, D.M. (2006) Effects of binary mixtures

of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 80 (4):382-395.

25- Lima, L. P., Barros, I. A., Lisbôa, P. C., Araújo, R. L., Silva, A., Rosenthal, D., Ferreira, A. C. F., Carvalho, D. P. (2006) Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids*. 71(8): 653-659.

26- Mandiki, S. N. M., Babiak, I., Bopopi, J. M., Leprieur, F., Kestemont, P. (2005). Effects of sex steroids and their inhibitors on endocrine parameters and gender growth differences in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles. *Steroids*. 70(2): 85-94.

27- Maradonna, F., Polzonetti, V., Bandiera, S. M., Migliarini, B., Carnevali, O. (2004) Modulation of the hepatic $CYP^{1}A^{1}$ system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. *Environmental Science and Technology*. 38(23): 6277-6282.

28- McCormick, S. D., O'Dea, M. F., Moeckel, A. M., Lerner, D. T., Bjornsson, B. T. (2005) Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and $^{17}\beta$-estradiol. *General and Comparative Endocrinology*. 142(3): 280-288.

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

30- Montgomery-Brown, J., Reinhard, M. (2003) Occurrence and behavior of alkylphenol polyethoxylates in the environment. *Environmental Engineering Science*. 20(5): 471-486.

31- Norris, D. O., Carr, J. A. (2006) *Endocrine disruption*: biological bases for health effects in wildlife and humans. Oxford University Press, USA. pp: 104-375.

32- Olsen, C. M., Meussen-Elholm, E., Hongslo, J. K., Stenersen, J., Tollefsen, K. E. (2005) Estrogenic effects of environmental chemicals: an interspecies comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 141(3): 267-274.

33- Ostrander, G.K. (2005) *Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC, Florida. pp: 792.

34- Pait, A. S., Nelson, J. O. (2003). Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquatic Toxicology*. 64(3): 331-342.

35- Pedersen, S., Christiansen, L., Pedersen, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (1999) *In vivo* estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Science of the Total Environment*. 233(1-3): 89-96.

36- Preuss, T. G., Gehrhardt, J., Schirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P. D., et al. (2006) Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. *Environmental Science and Technology*. 40(16): 5147-5153.

37- Schoenfuss, H., Bartell, S., Bistodeau, T., Cediel, R., Grove, K., Zintek, L., et al. (2004) Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*. 205(1-2): 95-102.

38- Sciarrillo, R., Capaldo, A., Valiante, S., Gay, F., Sellitti, A., Laforgia, V., et al. (2010). Thyroid hormones as potential early biomarkers of exposure to nonylphenol in adult male lizard (*Podarcis sicula*). *Open Zoology Journal*. 3 17-22.

39- Segner, H. (2005) Developmental, Reproductive, and Demographic Alterations in Aquatic Wildlife: Establishing Causality between Exposure to Endocrine active Compounds (EACs) and Effects. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 33(1): 17-26.

40- Shioji, H., Tsunoi, S., Kobayashi, Y., Shigemori, T., Ike, M., Fujita, M., et al. (2006) Estrogenic activity of branched 4-nonylphenol isomers examined by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science*. 52(2): 132-141.

41- Sinha, N., Lal, B., Singh, T. (1991) Effect of endosulfan on thyroid physiology in the freshwater catfish, *Clarias batrachus*. *Toxicology*. 67(2): 187-197.

42- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J. (2008) Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*. 34(7): 1033-1049.

43- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrano, F. O. .(1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 103(Suppl 7): 113-120.

44- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Tew, K. (2002) Estrogens and environmental estrogens. *Biomedecine and Pharmacotherapy*. 56(1): 36-44.

45- Tollefsen, K. E., Eikvar, S., Finne, E. F., Fogelberg, O., Gregersen, I. K. (2008) Estrogenicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(2): 370-383.

46- Tollefsen, K. E., Mathisen, R., Stenersen, J. (2003) Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: a sensitive in vitro bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals. *Biomarkers*. 8(5): 394-407.

47- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. (2003) Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56(2): 271-281.

48- Verslycke, T., Vandenbergh, G. F., Versonnen, B., Arijs, K., Janssen, C. R. (2002) Induction of vitellogenesis in 17α-ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A method comparison. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology and Pharmacology*. 132(4): 483-492.

49- Vetillard, A., Bailhache, T. (2006) Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicological Sciences*. 92(2): 537.

50- Wheeler, J. R., Gimeno, S., Crane, M., Lopez-Juez, E., Morritt, D. (2005). Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 15(4): 293-306.

51- Xie, L., Thrippleton, K., Irwin, M. A., Siemering, G. S., Mekebri, A., Crane, D., Berry, et al. (2005) Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicological Sciences*. 87(2): 391.

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

53- Zaccaroni, A., Gamberoni, M., Mandrioli, L., Sirri, R., Mordenti, O., Scaravelli, D., et al. (2009) Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Science of the Total Environment*. 407(10): 3301-3306.

54- Zha, J., Wang, Z., Wang, N., Ingersoll, C. (2007) Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere*. 66(3): 488-495.