

## بررسی اثر ۴- نونیل فنل بر شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادوسوماتیک و تغییرات سطوح پلاسمائی IgM و فعالیت لیزوزیم در ماهی نابالغ ایمونوگلوبولین کپور کوی (*Cyprinus carpio*)

همایون حسین‌زاده صحافی\*<sup>۱</sup>، پریسا امانی‌نژاد<sup>۲</sup>، مهدی سلطانی<sup>۳</sup>

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۲- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵

۳- گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۹۹۶۳۱۱

تاریخ دریافت: ۲۹ دی ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۲۰ خرداد ۱۳۹۶

### چکیده

در این بررسی تاثیر ۴- نونیل فنل بر شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادوسوماتیک و تغییرات سطوح پلاسمائی IgM و فعالیت لیزوزیم پلاسمای خون ماهیان نابالغ نر و ماده کپور کوی بررسی شد. بدین منظور ماهیان در خلال سه هفته به صورت تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل و ۲ میکروگرم ۱۷-بتاسترادیول به ازای هر گرم وزن بدن دریافت نمودند. از ماهیان در روزهای ۰ و ۲۲ نمونه‌برداری به عمل آمد. به منظور اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین (IgM) از روش پیشنهاد شده Anderson و Siwicki و فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش الیزا تعیین شد. شاخص‌های کبدی (HIS) و تخمدانی (GSI) در جنس ماده و شاخص کبدی (HIS) در جنس نر با استفاده از روش Han- Htun تعیین شدند. نتایج این بررسی نشان داد که میزان سطوح ایمونوگلوبولین ام در غلظت ۵۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل (۵۵/۶۶±۲/۵۱) در جنس ماده و (۵۹±۲/۰۱) در جنس نر نیز در تیمار ۱۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل (۵۳±۲/۰۱) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ( $P < 0/05$ ). اما میزان سطوح ایمونوگلوبولین ام در غلظت ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل و ۲ میکروگرم ۱۷-بتاسترادیول کاهش معنی‌داری در مقایسه با غلظت ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۴-نونیل فنل داشت. میزان فعالیت لیزوزیم نیز در تیمار ۵۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل (۶۴/۳۳±۲/۰۸) در جنس ماده و (۶۲/۶۶±۲/۵۱) در جنس نر به طور معنی‌داری افزایش یافت. اما در بالاترین غلظت ۴-نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) و تیمار ۱۷-بتاسترادیول به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. همچنین تغییرات شاخص کبدی و تخمدانی در جنس ماده و نر مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد که شبه استروژن‌هایی نظیر ۴-نونیل فنل می‌تواند باعث اختلالات ایمونولوژیکی در ماهیان شده، سیستم ایمنی را سرکوب و از طریق فعالیت استروئیدهای جنسی و تعادل ایمنی، ماهیان را مستعد پذیرش انواع بیماری‌ها نماید و خطر ابتلا به بیماری را افزایش دهد.

**کلمات کلیدی:** ۴- نونیل فنل، ایمونوگلوبولین (IgM)، لیزوزیم، شاخص هپاتوسوماتیک، شاخص گنادوسوماتیک، کپور کوی.

\* عهده‌دار مکاتبات (✉) h\_hosseinzadeh@yahoo.com

## مقدمه

در دهه های گذشته، تأثیرات صنعتی شدن، کشاورزی متمرکز و توسعه شهری منجر به بروز مشکلات جدی آلودگی در اکوسیستم های دریائی شده است. امروزه به اثبات رسیده است که مواد آلاینده موجود در دریا، پیامدهای ناگوار مختلفی در سطح فرد، جمعیت و اکوسیستم دارند و بر عملکرد اندام ها، وضعیت تولید مثل، اندازه جمعیت و در نهایت تنوع زیستی تأثیر منفی می گذارند (Arukwe *et al.*, 1997). بسیاری از این مواد به طور بالقوه برای موجودات آبرزی سمی، ژنوتوکسیک و سرطانزا هستند (Berczi and Nagy, 1998). به تازگی این نگرانی به وجود آمده است که آلاینده های خاص زیست محیطی به اندازه برخی از ترکیبات طبیعی پتانسیل اثر گذاری بر روی سیستم غدد درون ریز را که مسئول تنظیم فرآیندهای حیاتی نظیر توسعه، رشد، سوخت و ساز و تولید مثل می باشد را دارند. این ترکیبات همچنین باعث ایجاد اثرات منفی در سلامتی یک موجود سالم، فرزندان آن و یا در نسل های بعدی می شوند. یکی از این ترکیبات که اثر استروژنیک داشته و ژنوتوکسین بودن آن نیز مشاهده شده است (Casini *et al.*, 2000). ۴-نونیل فنل اتوکسیلات می باشد که دارای پتانسیل اختلال در سیستم آندوکروینی موجودات زنده و به ویژه آبزیان می باشد (Colburn *et al.*, 1997). تمامی ترکیبات مختل کننده سیستم درون ریز نهایتاً از طریق پساب ها وارد اکوسیستم های آبی می شوند و بنابراین موجودات آبرزی در معرض خطر ترکیبات مختل کننده سیستم درون ریز قرار دارند (Tyler *et al.*, 1998). استروئیدهای جنسی حساس ترین هورمون ها در برابر اثر ترکیبات مختل کننده سیستم درون ریز هستند و برخی

از این ترکیبات مانند ۴-نونیل فنل از طریق اتصال به گیرنده های استروژنی در بدن پاسخی مشابه هورمون های جنسی استروئیدی ایجاد می کنند و سبب ایجاد اختلال در سیستم درون ریز ماهیان می شوند (Bjorkblom, 2009). نونیل فنل برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ تولید شد و سپس تولید و افزایش آن به صورت تصاعدی افزایش یافت. نونیل فنل در محیط های آبی در اثر تجزیه میکروبی نونیل فنل اتوکسیلات به وجود می آید. نونیل فنل اتوکسیلات یک آلکیل فنل اتوکسیلات (APEs) و یک سورفاکتانت غیر یونی است که به طور گسترده در سورفاکتانت ها، رنگ ها، شوینده ها، روغن های روان کننده و صنایع شیمیائی و صنعتی یافت می شود (Soares *et al.*, 2008). به طوری که میانگین غلظت ترکیب شبه استروژنی ۴-نونیل فنل در عضله و کبد کپورماهی تالاب انزلی به ترتیب ۱/۶۵ و ۳/۰۲ میکروگرم بر گرم برگرم اندازه گیری شد (Mortazavi *et al.*, 2012). تحقیقات متعددی نشان می دهد که پروتئین های ایمنی ذاتی ممکن است تحت تأثیر ترکیبات استروژنیک قرار گیرند (Moens *et al.*, 2006). برخی از این ترکیبات که مؤثر بر فعالیت پروتئین های ایمنی شناخته شده اند؛ شامل اتینیل استرادیول، نونیل فنل و بیس فنل آ می باشند. Belosevic و Wang (۱۹۹۹) در شرایط *invitro* نشان دادند که مواجهه با استرادیول پاسخ های ایمنی را در هموفلاژله ها (*Trypanosoma wski*) *danile* تعدیل می کند. علاوه بر آن Yamayuchi و همکارانش (۲۰۰۱) در شرایط *invitro* با استفاده از غلظت فیزیولوژیکی، نتایج مشابهی را از استرادیول و لکوسیت های اولیه در ماهی کپور بدست آوردند (Yamayuchi *et al.*, 2001). همچنین در بررسی که توسط Hoeger و

اندازه‌گیری شد. در کل دوره آزمایش هیچ‌گونه غذادهی صورت نگرفت.

### تزریق ماهیان

به منظور 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 با درجه خلوص ۹۵/۳٪ در خلال ۳ هفته و به صورت تزریق درون صفاقی تحت تزریق قرار گرفتند. همچنین ماهیان ۱ تیمار دوز ۲ میکروگرم بر گرم وزن بدن از ۱۷-بتاسترادیول (Sigma, USA) را به عنوان ژنواستروژن دریافت کردند. علت استفاده از ۱۷-بتاسترادیول در این مطالعه آزمون فرضیه اثر استروژنیک نونیل فنل بود. تزریق‌ها به میزان نصف دوز و یکبار در هفته انجام پذیرفت. گروه کنترل حلال تنها میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از حلال (روغن نارگیل + اتانول) را دریافت کردند، درحالی‌که بر روی ماهیان گروه کنترل هیچ‌گونه تزریقی صورت نگرفت.

### نمونه‌برداری

در روز ۲۲ از ماهیان نمونه‌برداری به عمل آمد. جهت نمونه‌برداری، پس از بیهوش نمودن و ثبت طول کل و وزن بدن، از ساقه دمی ماهیان به وسیله سرنگ ۲ میلی‌لیتری تیمار شده با هیپارین خونگیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور 3000g سانتیفریوژ گشته و پلاسما به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

همکارانش (۲۰۰۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با ۱۰ تا ۷۰ درصد فاضلاب گیاهان دارویی (شامل پلی آروماتیک هیدروکربن به همراه دیگر آلودگی‌ها) انجام شد، نتایج نشان داد که تعداد گردش لئوسیت‌ها کاهش یافته، اما ظرفیت تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافته است، علاوه بر آن این فاضلاب به طور قابل توجهی توانست هر عملکرد ایمنی دیگر مانند انفجار تنفسی، فاگوسیتوزیس، فعالیت لایوزیم، جمعیت لکوسیت‌ها به غیر از لئوسیت و تولید IgM اختصاصی آئروموناس سالمونسیدارا درستخوش تغییر نماید (Hdeger et al., 2004). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استروژنیک ۴-نونیل فنل بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین‌ام (IgM) و فعالیت لیزوزیم در ماهیان کپور کوی نابالغ بود.

### مواد و روش‌ها

#### تأمین ماهی و دوره‌سازی

این پژوهش در آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، در خرداد ماه ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی کپور کوی نابالغ نر و ماده (Cyprinus carpio) با میانگین وزنی (۵۰±۱۰) گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سازمان فنی و حرفه‌ای استان تهران تهیه شدند. ماهیان به صورت تصادفی در ۱۸ آکواریوم ۲۰ لیتری (۱۰ ماهی در هر آکواریوم) رها سازی شدند. جهت سازگاری ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آب روزانه به میزان ۸۰ درصد تعویض و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ۵-۱۰ ppt و PH=۶/۸)

## سنجش فاکتورهای پلاسمای خون

اندازه‌گیری میزان ایمنوگلوبولین ام (IgM)

پلازما:

به منظور اندازه‌گیری میزان ایمنوگلوبولین ام (IgM) از روش پیشنهاد شده Siwicki و Anderson در سال ۱۹۹۳ استفاده گردید. روش اندازه‌گیری به این صورت است که IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدرشدن محلول می‌شود. میزان کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم دارد. در این تحقیق IgM با استفاده از کیت شرکت Bioscience و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد (Anderson and Siwicki, 1993).

اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم پلازما

به منظور اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم از روش توصیه شده Ellis در سال ۱۹۹۰ استفاده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم به عنوان یکی از شاخص‌های ایمنی ذاتی با استفاده از سرم خون و روش جذب نوری به همراه سنجش کدورت صورت پذیرفت بدین منظور، در ابتدا ۱۵ میکرولیتر همولنف با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت ۹۶ خانه‌ای الیزا مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید (Ellis, 1990).

- روش سنجش شاخص‌های تخمدانی (GSI)

وکبدی

بافت‌های کبد و گناد به منظور محاسبه شاخص کبدی (HSI) و شاخص گنادی (GSI) توزین شدند. شاخص‌های HSI و GSI با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

- شاخص گنادی (GSI)

بر اساس فرمول زیر برای هر ماهی در هر تیمار محاسبه گردید، که در آن WG وزن گناد (گرم) و W، وزن کل بدن ماهی (گرم) است (Htun-Han, 1979).

$$GSI = WG / W \times 100$$

- شاخص کبدی (HSI)

بر اساس فرمول زیر برای هر ماهی در هر تیمار محاسبه گردید، که در آن WL وزن کبد (گرم) و W وزن کل بدن ماهی (گرم) است (Htun-Han, 1979).

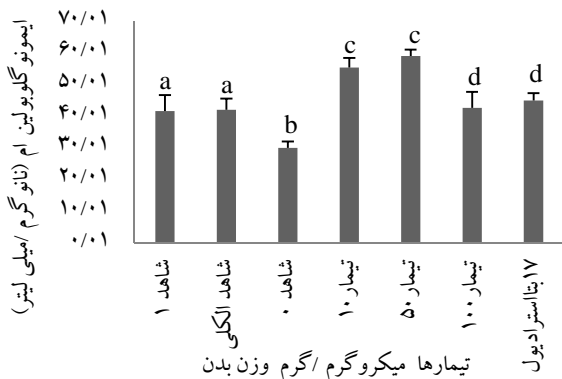
$$HSI = WL / W \times 100$$

جهت آنالیز آماری از نرم افزار ۱۶ SPSS استفاده گردید. تمامی مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است. ابتدا همگن بودن - گروه‌ها با آزمون پی‌پی پلات مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با توجه به همگن بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین تیمارهای آزمایشی از آزمون تجزیه واریانس (One-Way-ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد (Zar, 1999).

## نتایج

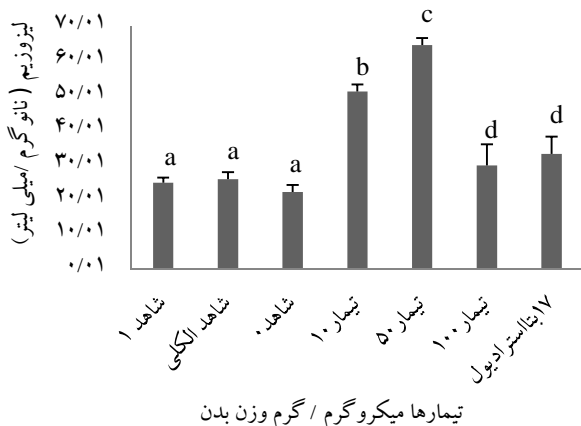
در طول دوره آزمایش هیچ گونه تلفاتی در ماهیان مشاهده نشد. نتایج حاصل از پژوهش در مورد اثرات

کنترل و تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل در جنس ماده کاهش یافت (شکل ۲).



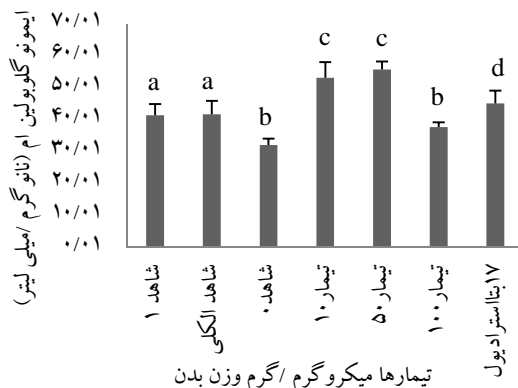
شکل ۲: غلظت ایمونوگلوبولین ام (IgM) پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتاسترادیول در جنس نر ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

میزان پروتئین لایزوزیم در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل در جنس ماده افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت (جدول ۲)، ولی در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل کاهش معنی داری پیدا کرد (P<۰/۰۱).



شکل ۳: غلظت پروتئین لایزوزیم پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتاسترادیول در جنس ماده ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

ماده ۴- نونیل فنل بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین ام (IgM) و فعالیت لیزوزیم در پلاسما خون ماهیان کپور کوی نابالغ بر حسب نانوگرم در میلی لیتر پلاسما مورد بررسی قرار گرفت، میزان ایمونوگلوبولین ام در غلظت‌های پایین و متوسط نونیل فنل ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم در جنس ماده به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد (جدول ۱)، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم در گرم) به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P<۰/۰۱) همچنین میزان IgM در گروه کنترل ۱ (نمونه برداری در روز ۲۱)، افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل صفر (نمونه برداری در ابتدای دوره) پیدا کرد (شکل ۱).



شکل ۱: غلظت ایمونوگلوبولین ام (IgM) پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتاسترادیول در جنس ماده ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

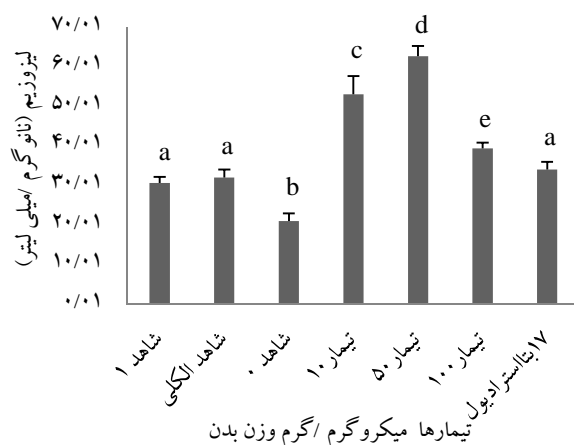
در جنس نر نیز میزان IgM در غلظت‌های پایین و متوسط نونیل فنل (۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم) به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (P<۰/۰۱)، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم در گرم) به طور معنی داری نسبت به گروه

در جنس ماده در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل به طور معنی داری افزایش یافته، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی داری مشاهده شد ( $P > 0/01$ ). شاخص GSI در تیمار ۱۷- بتاسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم بر گرم افزایش معنی داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل از خود نشان داد ( $P > 0/01$ ). اختلاف آماری معنی داری در میان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۵).

بررسی شاخص هیپاتوسوماتیک (HSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص HSI در جنس ماده در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل به طور معنی داری افزایش یافته، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی داری مشاهده شد ( $P > 0/01$ ). شاخص HSI در تیمار ۱۷- بتاسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم بر گرم افزایش معنی داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل از خود نشان داد ( $P > 0/01$ ). اختلاف آماری معنی داری در میان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۶). بررسی شاخص هیپاتوسوماتیک (HSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص HSI در جنس نر در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل به طور معنی داری افزایش یافته، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر گرم) کاهش معنی داری مشاهده شد ( $P > 0/01$ ). شاخص HSI در تیمار ۱۷- بتاسترادیول با غلظت ۲ میکروگرم بر گرم افزایش معنی داری در مقایسه با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل از خود نشان داد ( $P > 0/01$ ). اختلاف آماری معنی داری در میان ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۷).

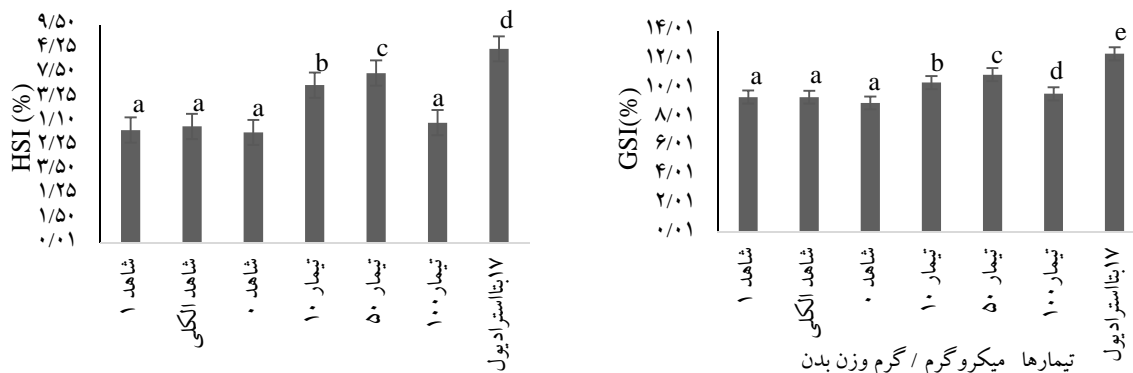
میزان لیزوزیم در تیمار ۱۷-بتاسترادیول (۲ میکروگرم در گرم) اختلاف معنی داری نسبت به تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل داشت. میزان لیزوزیم در گروه کنترل ۱ (نمونه بردای روز ۲۱) اختلاف معنی داری با گروه کنترل صفر (نمونه برداری در ابتدای دوره) پیدا نکرد (شکل ۳).

در جنس نر نیز میزان پروتئین لایزوزیم در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم افزایش معنی داری با گروه کنترل داشت، ولی در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل کاهش معنی داری پیدا کرد ( $P < 0/01$ ). میزان لیزوزیم در تیمار ۱۷-بتاسترادیول (۲ میکروگرم در گرم) اختلاف معنی داری با تیمارهای نونیل فنل و گروه کنترل داشت ( $P < 0/01$ ). همچنین میزان لیزوزیم در گروه کنترل ۱ (افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل ۰ از خود نشان داد (شکل ۴)).



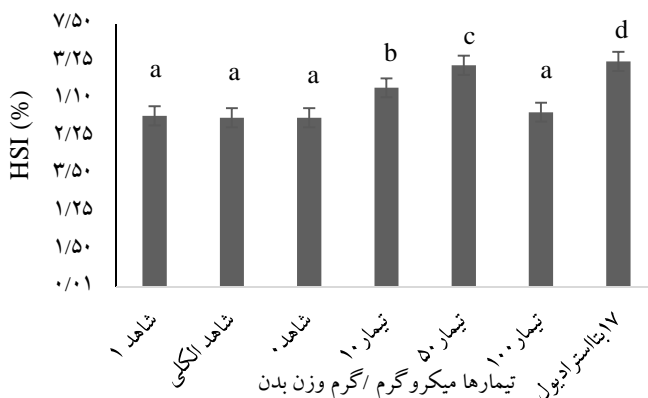
شکل ۴: غلظت پروتئین لایزوزیم پلاسما در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷-بتاسترادیول در جنس نر ماهی کپورکوی (n=10) حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

بررسی شاخص گنادوسوماتیک (GSI) در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که مقدار شاخص GSI



شکل ۶: شاخص هپاتوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷- بتاسترادیول در جنس ماده ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

شکل ۵: شاخص گنادوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷- بتاسترادیول در جنس ماده ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا e بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۷: شاخص هپاتوسوماتیک در اثر مواجهه با نونیل فنل و ۱۷- بتاسترادیول در جنس نر ماهی کپور کوی (n=۱۰) حروف a تا d بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵

کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل و تیمار ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن دیده شد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که سطوح ایمونوگلوبولین (IgM) پلاسما در جنس نر و ماده ماهی نابالغ کپور کوی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۴- نونیل فنل تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دارد. این در حالی بود که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۴- نونیل فنل و غلظت ۲ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۱۷- بتاسترادیول کاهش معنی داری در مقایسه با تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن دیده

## بحث

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد که ۴- نونیل فنل به طور قابل توجهی می‌تواند سبب تغییر در شاخص‌های هپاتوسوماتیک، گنادوسوماتیک و شاخص‌های ایمنی (IgM، لیزوزیم) در ماهی کپور کوی نابالغ شود. سطوح IgM پلاسما و فعالیت لیزوزیم در پاسخ به غلظت متوسط (۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ۴- نونیل فنل پس از ۲ روز افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت. این در حالی بود که در غلظت بالا (۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) ۴- نونیل فنل

در چندین گونه مشاهده شده است (Watanaki *et al.*, 2002). Luebke و همکارانش (۱۹۹۷) در تحقیقی نشان دادند که قرار گرفتن در معرض هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای منجر به کاهش پاسخ تکثیر لنفوسیت در ماهی مداکا می‌شود و تجزیه و تحلیل عمیق‌تر سبب شد که نویسندگان پیشنهاد دهند که اندام هدف در سلول‌های T وجود دارد، زیرا استقرار LPS بر تکثیر سلول‌های B و سلول‌های تشکیل‌دهنده آنتی‌بادی بی‌تأثیر بود (Luebke *et al.*, 1997). در مقابل کرئوزوت مایع (۳-۱۰ میکرولیتر در لیتر) شامل پلی آروماتیک هیدروکربن پس از مواجهه با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به کاهش انفجار تنفسی لکوسیت‌های سرکلیه شد، اما افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و نمایان شدن در صدی از سلول‌های Ig+ را در زمان کوتاهی به دنبال داشت. اگرچه پس از گذشت ۲۸ روز، فعالیت فاگوسیتوزی و انفجار تنفسی به سطح گروه کنترل بازگشت، اما میزان سلول‌های T در همان سطح کاهش یافته باقی ماند (Karrow *et al.*, 2001). همچنین در بررسی که توسط Hoeger و همکارانش (۲۰۰۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با ۱۰ تا ۷۰ درصد فاضلاب گیاهان دارویی (شامل پلی آروماتیک هیدروکربن به همراه دیگر آلودگی‌ها) انجام شد، نتایج نشان داد که تعداد گردش لنفوسیت‌ها کاهش یافته، اما ظرفیت تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافته است، علاوه بر آن این فاضلاب به طور قابل توجهی توانست هر عملکرد ایمنی دیگر مانند انفجار تنفسی، فاگوسیتوزیس، فعالیت لایزوزیم، جمعیت لکوسیت‌ها به غیر از لنفوسیت و تولید IgM اختصاصی آئروموناس سالمونسیدا را دستخوش تغییر نماید (Hoeger *et al.*, 2004). در

شد. در ماهیان Ig جزء اصلی پاسخ ایمنی همورال تطبیقی است. این تصور وجود دارد که در ماهیان تنها یک ایزومر ایمونوگلوبولین به نام IgM وجود دارد IgS در هر دو شکل غشائی یا محلول در فرآیند جایگزینی mRNA در غشاء لنفوسیت‌های B یافت و می‌توان برای جداسازی سلول‌های Ig+ و Ig- از آن استفاده نمود. تغییرات در سطوح IgM می‌تواند به عنوان یک شاخص در واکنش با استرس و کاهش ایمنی پس از مواجهه با مواد سمی مورد استفاده قرار گیرد (Jobling *et al.*, 1996). در ماهیان مکانیسم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی سلولار و همولار وجود دارد. پاسخ ایمنی در ماهیان ممکن است به عنوان یک مدل افزایشی یا جایگزین برای پیش‌بینی سم‌شناسی ایمنی آلودگی‌های محیطی استفاده شود، به طوری که توسط تعدادی از متخصصین نشان داده شده است (Dias and Maraes, 2007; Witeska, 2010). آلکیل فنل ۴-نونیل فنل (NP) یک شبه استروژن است و شاید یکی از بهترین EDCs‌های شناخته شده باشد. NP مهارکننده و ممانعت‌کننده از استقرار لیپوپلی ساکارید (LPS) ناشی از گرانولوسیت اتصال یافته (ND) و تولید TNF $\alpha$  (فاکتور  $\alpha$  نکروزدهنده تومور — رسپتورسیتوکین) شناخته شده که این مهار شدن به رسپتورهای استروژنی  $\alpha$  و  $\beta$  (ER $\beta$  - ER $\alpha$ ) نسبت داده شده که وابسته به درجه ممانعت از فعال شدن NF $\kappa$ B (رسپتور سیتوکین که موجب افزایش پاسخ ایمنی-تحریکی از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالی NF $\kappa$ B) می‌باشد (You *et al.*, 2002). همچنین استروژن نقش مهمی در هموستازی خون توسط تکثیر لنفوسیت‌های وابسته دارد، به طوری که کاهش میتوزن القائی تکثیر سلول‌های T و B در ارتباط با افزایش سطوح خونی EDCs

غلظت ۵۰۰ گرم در کیلوگرم وزن بدن مقدار کل لکوسیت‌ها را در ماهی کپور معمولی کاهش می‌دهد (Schwaiger *et al.*, 2000). با وجود این تناقضات استروژن‌ها و اختلال گران غدد درون ریز شبه استروژنی در اثرگذاری بر تعادل تکثیر در برابر لئوسیت‌ها دیده شدند.

در ماهیان، لیزوزیم به عنوان یک آنزیم با ویژگی‌های آنتی‌بیوتیکی است که از گلبول‌های سفید آزاد شده و فعالیت بیشتری نسبت به پستانداران دارد و در اکثر موارد به عنوان شاخص عملکرد ایمنی غیر اختصاصی استفاده می‌شود (Saurabh and Sahoo, 2008). در میزان فعالیت لیزوزیم تحت تأثیر فعالیت محرک‌های ایمنی است، بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش در میزان لیزوزیم، عموماً در نتیجه افزایش تعداد سلول‌های بیگانه خوار است که مقدار لیزوزیم سنتز شده در سلول را افزایش می‌دهد (Saha *et al.*, 2004). در تأیید این مطالعه تعدادی از پروتئین‌های ایمنی ذاتی به عنوان اندام هدف برای ترکیبات استروژنیک نشان داده شده‌اند. برخی از این ترکیبات که مؤثر بر فعالیت لیزوزیم شناخته شده‌اند؛ شامل اتینیل استرادیول، نونیل فنل و بیس فنل آ می‌باشند. تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که پروتئین‌های ایمنی ذاتی ممکن است تحت تأثیر ترکیبات استروژنیک قرار گیرند (Moens *et al.*, 2006). در تحقیقی که توسط Maule و همکارانش (۲۰۰۵) بر روی ماهیان چار قطب جنوب انجام شد (*Salvelinu alpinus*) انجام شد، نتایج نشان داد که اختلال در لیزوزیم دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پس از مواجهه با رژیم غذایی پلی کلروبی فنیل (PCB) به علت کاهش در فعالیت تجزیه‌کنندگی لیزوزیم در موکوس ماهیان چار قطب جنوب می‌باشد. Nakayama

مقابل تزریق درون صفاقی (ip) روغن دیزل استخراج شده از کف لجن، هیچ تأثیری بر فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) ایجاد نکرد، اما سرم لیزوزیم را سرکوب و تکثیر لئوسیت‌های سرکلیه را در پاسخ به هماگلو تینین افزایش داد (Tahir and Secombes, 1995). تأثیر استرادیول تعدیل‌یافته بر فعالیت عامل مکمل (کمپلمان)، فعالیت سرم پراکسیداز و IgM در ماهی شانگ که توسط Cuesta و همکارانش (۲۰۰۷) بررسی شد، نیز نشان داد که تزریق درون صفاقی (ip) تیمار ۱۷- بتاسترادیول ( $E_2$ ) موجب افزایش فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) یک روز پس از تزریق و فعالیت سرم پراکسیداز ۳ تا ۷ روز پس از تزریق شد. در این راستا تیمار  $E_2$ ، فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) و تولید IgM سرم را در آخرین زمان آزمایش سرکوب کرد (Cuesta *et al.*, 2008). نتایج این بررسی منطبق با سرکوب سنتز IgM و مهار سلول‌های تولیدکننده IgM در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد (Hou *et al.*, 1999a). همچنین ۱۷-بتاسترادیول ( $E_2$ ) در تعدادی از مطالعات در تکثیر لئوسیت و تولید IgM نشان داده شده است (Thilagam *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 1994; Cook, 1997) و اما دیگر مطالعات عکس این نتایج را بدست آوردند (Hou and Hun, 2001; Hou *et al.*, 1999b; Cuesta, 2007). نتایج متناقض نیز برای استروئیدهای جنسی نظیر EDCS ها گزارش شده است. اخیراً در تحقیقی که توسط Yin و همکارانش (۲۰۰۷) صورت گرفت، نتایج نشان داد که بیس فنل آ (BPA) در غلظت ۰/۰۵۴ تا ۵/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر موجب تکثیر لئوسیت در ماهیان قرمز (*Carassius auratus*) می‌شود. این در حالی است که مواجهه مزمن NP در غلظت ۵ تا ۱۵ گرم در لیتر و تزریق اتینیل استرادیول در

(Taysse et al., 1995). علاوه بر آن پنتاکلروفنل باعث کاهش تولید ماکروفاژ سیتوکینز در ماهیان طلایی (Goldfish) شد (Chen et al., 2005)، اما فاگو سیتوز فعال شده و عملکردهای ایمنی و مقاومت بیماری زایی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان بدون تغییر باقی ماند (Shelley et al., 2009). به عبارت دیگر تحریک ایمنی اختصاصی تاکنون با تغییر در سطوح استروئیدهای جنسی گزارش شده است. به عنوان مثال سطوح سرم  $E_2$  به طور چشمگیری در عفونت خفیف ماهی سیم دریایی (*Sparu sarba*) کاهش یافته و در سطحی پایین در طول دوره عفونت باقی می ماند. همچنین گاهی تغییر در ایمنی اکتسابی در ماهیان تیمار شده با شبه استروژن مشاهده شده است. این اثرات در ابتدا بوسیله اندازه گیری سطوح آنتی بادی هایی است که به طور اختصاصی در برابر باکتری های مختلف آروکلر ۱۲۵۴، تی بی تی (TBT) و نونیل فنل (NP) که به تنهایی و یا در ترکیب سرکوب شده شنا سایی می شوند (Rice and Xiang, 2000; Iwanowicz et al., 2009) در مجموع تغییرات در عملکرد لکوسیت ها، پروتئین های مرتبط با ایمنی و آنتی بادی های تولید شده بوسیله ژن های ژنو استروژن ها و ژنو آندروژن ها باعث می شود که حیوانات نسبت به پاتوژن ها بسیار حساس تر شوند. مقدار شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) و گنادوسوماتیک (GSI) در جنس ماده در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل به طور معنی داری افزایش پیدا کرد، اما در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم در گرم) به طور معنی داری کاهش یافت. شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) در جنس نر در غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل به طور معنی داری افزایش یافت، ولی در غلظت بالای نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم در گرم)

و همکارانش (۲۰۰۸) نیز تأثیر آلودگی سنگین نفتی (۳۸ گرم در لیتر به مدت ۳ روز) را در ماهی کفشک ژاپنی (*Paralichthy olivaceus*) با استفاده از میکروآرایش cDNA مورد ارزیابی قرار دادند، آنها دریافتند که یک تغییر در ایمنی در ارتباط با ژن ها که شامل تنظیم کاهشی در زنجیره سبک ایمونوگلوبولین، CD45، ترکیب اصلی بافت پیوندی آنتی ژن های کلاس II و عامل پیش ساز تحریک کننده کلونی ماکروفاژ و تنظیم افزایشی در ۸- اینترلوکین و لیزوزیم دیده می شود. علاوه بر آن در انکوباسیون خارج سالنی با روغن خالص و پلی آروماتیک هیدروکربن تک حلقه ای (PAHs) در پلاسماهای ماهی باس دریایی اروپایی، تغییر معنی داری در میزان لیزوزیم و فعالیت عامل مکمل (کمپلمان) جایگزین به وجود آمد (Nakayama et al., 2009). در مطالعه دیگری با استفاده از آروکلر ۱۲۴۸ در ماهی سرگنده قهوه ای (*Ameiurus nebulosus*) کاهش در فعالیت ضد باکتریایی و نیز آنتی بادی دیده شد (Iwanowicz et al., 2001). ترکیب پلی کلرو بی فنیل ها (آروکلر ۱۲۴۲، ۱۲۵۴، ۱۲۶۰) قادر به تغییر در میزان لیزوزیم و فعالیت ROS در *L. limanda* شد (Iwanowicz et al., 2005). Siwicki و همکارانش (۱۹۹۰) نشان دادند که قرار گرفتن در معرض تری کلرو فون باعث کاهش در سطوح لیزوزیم سرم، تکثیر لنفوسیت، انفجار تنفسی و بیگانه خواری در لکوسیت های ماهی کپور معمولی شد (Siwicki et al., 1990). اما تغییری در تولید آنتی بادی های اختصاصی دیده نشد (Cossarini-Dunier et al., 1990). در میان آن ها فنل، هیدروکینون پیروکتکول سبب کاهش در فعالیت سیتوتوکسیک سلول های واسطه در لنفوسیت های طحال، در ماهی کپور معمولی شدند

کاهش یافت و دارای اختلاف آماری معنی‌داری با غلظت‌های متوسط و پایین نونیل فنل بود ( $P < 0.01$ ) (شکل ۷). کبد مهمترین عملکردها را برای متابولیسم، دفع، تغییر و دگرگونی زیستی مواد آلاینده و همچنین بزرگترین محل برای ذخیره و تجمع این مواد را دارا می‌باشد (Cengiz and Unlu, 2006) بیشترین استروژن در ماهی ماده ۱۷-بتا استرادیول است که ابتدا در تخمدان توسط سلول‌های فولیکولی تولید می‌شود و به علت اهمیت این هورمون در ایجاد علائم رفتاری تولید مثلی، نمو و نگهداری علائم ثانویه جنسی، استروژن و آندروژن در تولید گامت‌ها نقش دارند. در ماهیان تولید استرادیول در تخمدان منجر به سنتز مقدار بسیار زیادی پروتئین ویتلوژنین توسط هیپاتوسیت‌ها (سلول‌های کبدی) می‌شود. این لیپو پروتئین سنگین، پیش ماده پروتئین زرده، از سلول‌های کبدی توسط سیستم جریان خون به تخمک‌ها انتقال پیدا کرده و در توسعه تخمک و رسیدگی آن دخالت می‌کند. بنابراین نونیل فنل نیز به دلیل شباهت ساختاری زیادی که با استرادیول دارد، می‌تواند چنین نقشی را ایفا کند و بدلیل ویژگی تجمع دهنده‌گی بالای سلول‌های کبدی میزان ۴- نونیل فنل در کبد کپور ماهی بالاتر از عضله آن اندازه‌گیری شده است (Hiramatsu et al., 2005). بر همین اساس مطالعات Lye و همکاران (۱۹۹۹)، در بررسی میزان ۴-نونیل فنل و بیس فنل آدر عضله و کبد ماهیان مصب‌های Tees و Tyne انگلستان، Bjerregaard و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعات آزمایشگاهی در بررسی میزان بیس فنل آدر کبد و عضله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و نیز Shao و همکاران (۲۰۰۵)، در مقایسه میزان ترکیبات فنلی در آبشش و کبد نسبت به عضله دو گونه ماهی *Coreius*

(*hetetodon*) و (*Rhithogobio ventralis*)، بالا بودن میزان این ترکیبات را در کبد نسبت به عضله گزارش و تأیید نموده‌اند. علاوه بر این عوامل شبه استروژنی نقش استروژن را بازی کرده، به گیرنده‌های کبدی متصل شده و باعث تحریک ترشح ویتلوژنین می‌شوند. لذا می‌توانند در فعالیت این غده و تغییرات وزن آن در زمان تحریکات ترشحی مثل ترشح ویتلوژنین نقش داشته باشند. در تحقیق حاضر تغییرات و معنی‌دار بودن شاخص کبدی در تیمارهای نونیل فنل با غلظت ۵۰ میکرو گرم بر گرم وزن بدن ماهی، در ماهی نر و ماده، بر نقش کبد در دفع سموم و عوامل آلوده‌کننده حکایت دارد، زیرا کبد نقش مهمی در دفع سموم در مهره‌داران دارد. همچنین باید اشاره نمود که شاخص کبدی به طور طبیعی در زمان ویتلوژنر افزایش می‌یابد. Cody و Barton (۱۹۹۹) نشان دادند که شاخص کبدی در زمانی که ماهی در معرض ماده استروژن‌زا بوده و تغذیه نداشته است؛ کاهش می‌یابد؛ اما وزن کبد ممکن است به علت تغییرات پاتولوژیک افزایش یابد. در مطالعه حاضر، شاخص کبدی بعد از در معرض قرار دادن با نونیل فنل درد و جنس نر و ماده، در تیمارهای ۵۰ میکرو گرم بر گرم نونیل فنل بر وزن بدن ماهی، افزایش یافته است که به نظر می‌رسد به خاطر افزایش تحریکات تولید ویتلوژنین در کبد باشد که منجر به افزایش وزن کبد شده است و به علت افزایش تحریکات تولید ویتلوژنین ضریب هیپاتوسوماتیک، افزایش یافته است. Martin- Skilton و همکاران (۲۰۰۶) اثر نونیل فنل با *turbot* ۳۰ میکرو گرم در لیتر را بر روی ماهی *(Scophthalmus maximus)* نابالغ و روغن ماهی نابالغ *(Gadus morhua)* مورد بررسی قرار دادند. با قرار گرفتن در معرض نونیل فنل میزان فاکتور وضعیت (CF)

استروژنی ۴- نونیل فنل را بر سنترویتلوژنین در جنس نر ماهی کفشک (*platichthys flesus*) مورد سنجش قرار دادند. در این تحقیق ماهیان در مدت ۲ هفته به صورت تزریق درون صفاقی (iP) دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در گرم وزن بدن از ماده ۴- نونیل فنل دریافت کردند. تزریق داخلی صفاقی نونیل فنل در طول دوره اسپرماتوزن در ماهی کفشک باعث افزایش ویتلوژنین پلاسما به صورت وابسته به غلظت شد. علاوه بر آن افزایش میزان ویتلوژنین سبب افزایش معنی دار در شاخص هپاتوسوماتیک (HSI) و میزان RNA کل در کبد شد. نتایج این بررسی نشان داد که درصد تلفات در دوزهای بالای ۴- نونیل فنل (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در گرم وزن بدن) به میزان قابل توجهی افزایش یافت. همچنین تزریق داخل صفاقی نونیل فنل در طول دوره اسپرماتوزن در ماهی نر *eelpout* (*Zoarces viviparous*) باعث کاهش معنی دار در شاخص گنادوسوماتیک (GSI) و افزایش ویتلوژنین پلاسما به صورت dose-dependent شد. ضمن اینکه مطالعات بافت شناسی نشان داد که لوبول های seminiferous در ماهی های تزریق شده، دژنره شدند (Christiansen *et al.*, 1998). Zha و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی خود نشان دادند که مواجهه ماهی Rare minnow (*Gobio cypris rarus*) بالغ به مدت ۲۸ روز با غلظت های ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل باعث افزایش شاخص گناد و سوماتیک در جنس نر و نیز القاء ویتلوژنین در پلاسما جنس نر شد. همچنین غلظت ۳۰ میکروگرم در لیتر باعث هایپرتروفی، تجمع مواد ائوزینوفیلی و ایجاد آسیب در ساختار سلولی کبد شد. در کلیه نیز غلظت ۳۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنل باعث تجمع مواد ائوزینوفیلی و همچنین ایجاد هموراژی

و شاخص کبدی (HSI) در ماهی turbot به طور معنی داری بالاتر از تیمار کنترل مشاهده شد. در مقابل، میزان CF و HSI در روغن ماهی تفاوت معنی داری با تیمار کنترل نداشت. در این آزمایش به خاطر بالاتر بودن فعالیت آنزیم خنثی کننده زنبویوتیک (GST) در روغن ماهی نسبت به ماهی turbot، میزان حساسیت روغن ماهی در مقابل نونیل فنل کمتر از ماهی turbot بود. در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۰۹) مقدار شاخص HSI در اثر مواجهه با ۱۷-بتااسترادیول (E<sub>2</sub>) به مدت ۲۱ روز به اندازه ۲ برابر افزایش یافت که علت آن، افزایش تولید ویتلوژنین در پاسخ به استرادیول مطرح شد. افزایش شاخص HSI در پاسخ به ترکیبات استروژنی در مطالعات دیگر نیز گزارش شد (Verslycke *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2005). در تحقیق دیگری قرار گرفتن ماهی نابالغ قزل آلائی رنگین کمان به مدت ۴ روز در معرض نونیل فنل با غلظت ۱۸ میکروگرم در لیتر، افزایش شاخص کبدی (HSI)، افزایش بیان ژن ویتلوژنین و کاهش لنفوسیت های خون را به دنبال داشت. همچنین قرار گرفتن در معرض نونیل فنل باعث افزایش تلفات در تست مقاومت به بیماری شده است (Shelley *et al.*, 2009). نونیل فنل در کبد جنس نر نیز که در حالت طبیعی ویتلوژنین تولید نمی کند، باعث تولید ویتلوژنین می شود. زیرا سلول های کبدی در جنس نر نیز دارای گیرنده های استروژنی می باشند و نونیل فنل با اتصال به این گیرنده ها منجر به تولید ویتلوژنین در کبد می شود. همچنین افزایش وزن کبد ممکن است ناشی از تغییرات پاتولوژیکی (هایپرتروفی و هایپرپلازی) ایجاد شده در کبد بر اثر مواجهه با آلاینده ها باشد (Schlenk *et al.*, 2008). Christiansen و همکاران (۱۹۹۸) اثر ماده شبه

3. Bjorkblom, C., 2009. Assessment of endocrine disrupting activities in the aquatic environment. Academic dissertation. Bo Akademi University. 12 p.
4. Bartone, S., Cody, R., 1999. Morphological masculinization in poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns River, Florida, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 150-156.
5. Berczi, I., Nagy, E., 1998. Hormones as immune modulating hormones. In: Thomas E, Kresina F, Editors. *Immune modulating agents*. New York: Marcel Dekker Inc., 75-120.
6. Casini, S., Fossi, M.C., Mori, G., Bjornstad, A., 2000. Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17  $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol. *Environmental Monitoring and Assessment*, 75, 235-239.
7. Chen, X., Yao, G., Hou, Y., 2005. Pentachlorophenol reduces B lymphocyte function through proinflammatory cytokines in *Carassius auratus*. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 239-245.
8. Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, A., 1998. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout (*Zoarces viviparus*). *Marine Environmental Research*, 46, 141-144.
9. Cengiz, E.I., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, (*Gambusia affinis*) A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21, 246-253.
10. Colburn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P., 1997. *Our stolen future*. Plume Penguin Books. New York, NY, 316 p.
11. Cook, J., 1994. The effects of stress background colour and steroid hormones on the lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, University of Sheffield. 129 P.
12. Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Siwicki, A.K., 1990. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorophenon on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). I. Effect of contamination on antibody production in relation to residue level in organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19(1), 93-98.
13. Cuesta, A., Vargas-Chacoff, L., Garcia-Lopez, A., Arjona, F.J., Martinez-Rodriguez, G., Meseguer, J., Mancera, J.M., Esteban, M.A., 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune

در توبول‌های کلیوی و هایپرتروفی اپی‌تلیوم توبول‌ها شد. در این آزمایش پیشنهاد شد که علت بروز آسیب‌های کبدی و کلیوی مشاهده شده می‌تواند به خاطر تولید و تجمع ویتلوژنین باشد (Zha *et al.*, 2007). در مطالعه حاضر مقدار شاخص GSI در جنس ماده در تمامی تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل داشت، اما در غلظت متوسط (۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) مقدار این شاخص افزایش جزئی نسبت به گروه کنترل داشت که می‌تواند به دلیل تجمع ویتلوژنین در تخمدان باشد. این مطالعه نشان داد که ۴-نونیل فنل می‌تواند باعث اختلالات ایمنولوژیکی در ماهیان شود که موجب تضعیف و سرکوب سیستم ایمنی و در نهایت منجر به مرگ ماهیان شود.

### سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی و نیز کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی و تمامی کسانی که در انجام مراحل مختلف این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

### منابع

1. Arukwe, A., Forlin, L., Goksoyr, A., 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2576-2583.
2. Bjerregaard, P., Hansen, P.R., Larsen, K.J., Erratico, C., Korsgaard, B., Holbech, H., 2007. Vitellogenin as a biomarker for estrogenic effects in brown trout, (*Salmo trutta*). Laboratory and field investigations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 2387-2396.

- immunomodulation. *Aquatic Toxicology*, 72(4), 305-314.
27. Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., Mc Cormick, S.D., Vanveld, P.A., Ottinger, C.A., 2009. Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Aquatic Toxicology*, 93, 70-82.
  28. Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mathiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition testicular growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environmental Toxicology*, 15, 194-202.
  29. Karrow, N.A., Bols, N.C., Whyte, J.J., Solomon, K.R., Dixon, D.G., Boermans, H.J., 2001. Effects of creosote exposure on rainbow trout pronephros phagocyte activity and the percentage of lymphoid B cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health .Part A: Current Issues*, 63(5), 363-381.
  30. Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A., Zelikoff, J., 1997. Aquatic Ppollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundamental and Applied Toxicology*, 37(1), 1-15.
  31. Maule, A.G., Jorgensen, E.H., Vijayan, M.M., Killie, J.E.A., 2005. Aroclor 1254 exposure reduces disease resistance and innate immune responses in fasted arctic charr., *Environmental Toxicology*, 24, 117-124.
  32. Martin-Skilton, R., Thibaut, R., Porte, C., 2006. Endocrine alteration in juvenile cod and turbot exposed to dispersed crude oil and alkylphenols. *Aquatic Toxicology*, 78, 57-64.
  33. Moens, L.N., Van der ven, K., Remortel, P.V., DeFavero, J., DeCoen, W.M., 2006. Expression profiling of endocrine - disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicology Sciences*, 93, 298-310.
  34. Mortazavi, S., Riyahi-Bakhtiari, A., Sari, A.E., Bahramifar, N., Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrinedisrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1067-1073.
  35. Nakayama, A., Kurokawa, Y., Harino, H., Kawahara, E., Miyadai, T., Seikai, T., Kawai, S., 2008. Effects of tributyltin on the immune system of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquatic Toxicology*, 83, 126-133.
  36. Nakayama, K., Kitamura, S., Murakami, Y., Song, J.Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Iwata, H., Tanabe, S.T., 2009. Toxicogenomic analysis of immune system -related genes in Japanese parameters of gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 693-700.
  14. Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Molecular Immunology*, 45(8), 2333-2342.
  15. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel. *Techniques in Fish Immunology*, 1, 1-103.
  16. Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2003. Cytokines and the immunotesticular axis. *Journal of Reproductive, Immunology*, 58(1), 1-26.
  17. Hiramatsu, N., Cheek, A.O., Sullivan, C.V., Matsubara T., Hara, A., 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: T.P. Mommsen & T.W. Moon, *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6, 431-471.
  18. Hoeger, B., van den Heuvel, M.R., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 70(4), 345-355.
  19. Hou Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Changes in immunoglobulin producing cells in response to gonadal maturation in rainbow trout. *Fisheries Science*, 5, 44-965.
  20. Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Effects of steroids on the antibody producing activity of lymphocytes in rainbow trout. *Fisheries Science*, 2, 580.
  21. Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Effects of steroids on immunoglobulin (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Bio-chemistry*, 20, 155-162.
  22. Hou, Y., Han, X.D., 2001. Effects of estradiol-17beta on immunocompetence in rainbow trout. *Acta Zoologica Sinica*, 47, 285-291.
  23. Htun-han, M., 1977. The effects of photoperiod on reproduction in fishes: an annotated bibliography. *Fish Food G B.*, 6, 30.
  24. Imai, S., Koyama, J., Fujii, K., 2005. Effects of 17b-estradiol on the reproduction of Javamadaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 708-714.
  25. Iwanowicz, L.R., Ottinger, C.A., 2001. Estrogens, Estrogen Receptors and Their Role as Immuno-regulators in Fish. In book: *Fish Defenses Vol. 1: Immunology*, Chapter: 9, Publisher: Science Publishers, pp.277-322.
  26. Iwanowicz, L.R., Lerner, D.T., Blazer, V.S., McCormick, S.D., 2005. Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: indicationso fshort-and long-term

- wastewaters. *Environmental International*, 34, 1033-1049.
47. Suzuki, Y., Orito, M., Iigo, M., Kezuka, H., Kobayashi, M., Aida, K., 1997. Seasonal changes in blood IgM levels in goldfish, with special reference to water temperature and gonadalmaturation. *Fisheries science*, 62, 754-759.
  48. Taysse, L., Troutaud, D., Khan, N.A., Deschaux, P., 1995. Structure activity relationship of phenolic compounds (phenole, pyrocatechol andhydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology*, 98, 207-214.
  49. Tahir, A., Secombes, C.J., 1995. The effects of diesel oil-based drilling mud extracts on immune responses of rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(1), 27-32.
  50. Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, 36, 49-54.
  51. Thilagam, H., Gopalakrishnan, S.B.O.J., Wang, K.J., 2009. Effect of 17beta-estradiol on the Immunocompetence of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 1722-1731.
  52. Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28 319-61.
  53. Verslycke, T., Vandenberg, G.F., Versonnen, B., Arijs, K., Janssen, C.R., 2002. Induction of vitellogenesis in 17a-ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132, 483-492.
  54. Wang, R., Belosevic, M., 1999. Estradiol increases susceptibility of goldfish to trypanosome anilewskyi. *Developmental and Comparative Immunology*, 18, 377-387.
  55. Watanuki, H., Yamaguchi, T., Sakai, M., 2002. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11 ketotestosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132, 407-413.
  56. Witeska, M., Knodera, E., Lugowski, K., 2010. The effects of Ichthyophthiriasis on some hematological parameters in common carp. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34, 267-271.
  57. Yamaguchi, T., Watanuki, H., Sakai, M., 2001. Effects of estradiol, progesterone and flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 445-452.
  37. Rice, C.D., Xiang, Y., 2000. Immunefunction, hepatic CYP1A, and reproductive biomarker responses in the gulf killifish *Fundulus grandis*, during dietary exposures to endocrin disrupters. *Marine Environmental Research*, 50, 163-168.
  38. Saha, N.R., Usami, T., Suzuki, Y., 2004. In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 17, 149-158.
  39. Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysosyme: An important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39, 223-239.
  40. Schlenk, D., Handy R., Steinert S., Depledge M.H., Benson W., 2008. Biomarkers. In: R.T. Di Giulio & D.E. Hinton, *The Toxicology of fishes*, 3, 683-731.
  41. Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R.D., 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethiny-lestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Nile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 51, 69-78.
  42. Shao, B., Hu, J., Yang, M., An, W., Tao, S., 2005. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 467-73.
  43. Shelley, L.K., Balfry, S.K., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2009. Immunotoxicological effects of sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 92(2), 95-103.
  44. Siwicki, A.K., Cossarini-Dunier, M., Studnicka, M., Demael, A., 1990. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19(1), 99-105.
  45. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
  46. 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

- and tumor necrosis factor-alpha expression by 4-nonylphenol in macrophages. Biochemical and Biophysical. Research Communication, 294, 753-759.
60. 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.
61. Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. (4th Edition) New Jersey, 663 p.
- testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes in vitro. Comparative Biochemistry and Physiology, 129, 49-55.
58. Yin, D.Q., Hu, S.Q., Gu, Y., Wei, L., Liu, S.S., Zhang, A.Q., 2007. Immunotoxicity of bisphenol A to *Carassius auratus* lymphocytes and macrophages following in vitro exposure. Journal of Environmental Sciences, 19, 232-237.
59. You, H.J., Choi, C.Y., Jeon, Y.J., Chung, Y.C., Kang, S.K., Hahm, K.S., Jeong, H.G., 2002. Suppression of inducible nitric oxide synthase