

## استفاده از هورمون‌های تیروئیدی و میکرونوکلئوس به عنوان بیومارکرهای اولیه در مواجهه با ماده آلاینده بیس فنل آ در ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*)

احمد نگین تاجی<sup>۱</sup>، بیتا ارچنگی<sup>۲\*</sup>، عبدالعلی موحدی‌نیا<sup>۳</sup>، علیرضا صفاهیه<sup>۴</sup>، غلامرضا اسکندری<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اکولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی: ahmad\_negintaji@yahoo.com

۲- بیتا ارچنگی، استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی: bita.archangi@gmail.com

۳- عبدالعلی موحدی‌نیا، استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی: amovahedinia@yahoo.com

۴- علیرضا صفاهیه، استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، پست الکترونیکی: safahieh@hotmail.com

۵- غلامرضا اسکندری، استادیار گروه بیولوژی دریا، پژوهشکده آبرزی پروری جنوب کشور، پست الکترونیکی: eskandari1344@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۰

\*نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲۴

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۲، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

### چکیده

بیس فنل آ (BPA) مونومری است که به دلیل استفاده از آن در تولید پلاستیک‌های پلی کربناته و رزین‌های اپوکسی به طور گسترده از راه‌های مختلف وارد زیست‌بوم‌های آبی شده است. این ماده یکی از ترکیبات مختل‌کننده اندوکرینی است. در مطالعه حاضر اثر BPA بر تعادل هورمون‌های تیروئیدی و پتانسیل سیتوژنوتوکسیک این ماده در جنس نر ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) صید شده از منطقه‌ی خور موسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌داری در مقادیر هورمون تری‌یدوتیرونین پلازما و افزایش مقادیر تیروکسین پلازما‌ی ماهیان تیمار شده در مقایسه با ماهیان کنترل و دریک رفتار وابسته به دوز بود. همچنین BPA باعث القای میکرونوکلئوس در روندی وابسته به دوز شد. داده‌های این مطالعه نشان‌دهنده پتانسیل BPA در ایجاد اختلالات اندوکرینی و سمیت سیتوژنتیکی است.

کلمات کلیدی: هورمون‌های تیروئیدی، بیس فنل آ، زنوبیوتیک، تزریق درون صفاقی، شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*).

### ۱. مقدمه

و غیرمستقیم موجب اختلال در سامانه‌های اندوکرینی انسان و حیوانات گردند به‌وجود آمده است (Damstra et al., 2002; Matthiessen, 2003). نقش این مواد که ترکیبات مختل‌کننده

طی دو دهه‌ی گذشته، نگرانی‌های زیادی در ارتباط با برخی مواد شیمیایی که قادرند به واسطه مکانیسم‌های مستقیم

قرار گرفته است. (Al-Sabti, 1995; 1995b; Marlasca et al., 1998; Bolognesi et al., 2006 a; Kohler and Ellesat, 2008). بیس فنل آ<sup>۳</sup> یک ترکیب شیمیایی صنعتی با حجم تولید بالا در کل دنیا است و به‌عنوان یک مونومر به‌طور وسیعی در تولید پلاستیک‌های پلی کربناته و رزین‌های اپوکسی، پوشش دیواره داخلی قوطی‌های کنسرو مواد غذایی، مواد پرکننده دندان و بسیاری از تولیدات صنعتی دیگر به‌کار می‌رود. افزایش تقاضای جهانی برای ماده بیس فنل آ باعث افزایش تولید این محصول از ۳/۵ میلیون تن در سال ۲۰۰۶ به حدود ۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ گردیده است (Wei et al., 2011). بیس فنل آ اثر استروژنیک (Wozniak and Murias, 2008) و یا قدرت آنتی آندروژنیک (Howdeshell et al., 1999) قابل ملاحظه‌ای دارد؛ عمل استروژن را تقلید کرده و به‌عنوان یک ماده مختل‌کننده اندوکرینی مشهور است که با سامانه‌های هورمونی در حیوانات و انسان‌ها مداخله نموده و سلامتی آن‌ها را تهدید می‌کند. همچنین خواص ژنوتوکسیک آن با آزمایش بر روی موش‌ها، سلول‌های انسانی و ماهیان به اثبات رسیده است (Pacchierotti et al., 2008). حضور این ماده در فاضلاب شهری و پساب‌های صنعتی و ورود به زیست‌بوم‌های آبی تاثیر زیان باری بر روی موجودات آبرزی می‌گذارد.

ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس به‌شمار می‌آید. داشتن ارزش اقتصادی و بوم‌شناختی بالا، ویژگی‌های جنسیتی آن، میزان صید زیاد جهت مصرف انسانی، سازگاری آسان با شرایط اسارت، در دسترس بودن فن‌آوری پرورش آن (Sa et al., 2006) و داشتن میزان خون و بافت کافی جهت مطالعه آن را به گونه‌ای مهم به‌منظور مطالعات اکوتوکسیکولوژی در خلیج فارس تبدیل نموده است. ماهی شانک زردباله یک ماهی هرمافرودیت پروتاندروس است (Hesp et al., 2004). بنابراین آلاینده‌های زنواستروژن<sup>۴</sup> تمایز جنسی این گونه را تحت تاثیر قرار می‌دهند. یکی از زیستگاه‌های اصلی شانک زردباله در آب‌های جنوبی کشور، منطقه خور موسی است. از این‌رو ورود پساب‌های متنوع تاسیسات پتروشیمی به این خور می‌تواند منجر به مواجهه این گونه با طیف وسیعی از ترکیبات آلاینده به ویژه موادی با داشتن توانایی اختلال در سامانه اندوکرینی از جمله بیس فنل آ گردد. با توجه به اهمیت

اندوکرینی<sup>۱</sup> (EDCs) نامیده می‌شوند در ایجاد اختلالات تولید مثلی، ناهنجاری‌های رشدی و انواع مختلفی از سرطان‌ها در انسان و حیوانات توسط محققین مختلف تایید شده است (Segner, 2006; Amaral Mendes, 2002; 2005; Gross-Sorokin et al., 2006). اثر ترکیبات مختل‌کننده اندوکرینی بر تعادل هورمونی موجودات، در سال‌های اخیر باعث افزایش نگرانی‌های بسیاری شده است (Hutchinson et al., 2000; Legler and Brouwer, 2003; Park et al., 2006; Thibaut and Porte, 2004; Todorov et al., 2002). ترکیبات مختل‌کننده اندوکرینی به مواد یا ترکیبات خارجی گفته می‌شود که باعث تغییر در عملکرد سامانه‌ی درون‌ریز می‌شوند و بدین‌وسیله موجب ایجاد اثرات مضر در یک موجود سالم یا فرزند آن، جمعیت یا زیرجمعیت‌های آن می‌شوند (European Commission, 1997). در ماهیان استخوانی هورمون‌های تیروئیدی در رشد، نمو و تولیدمثل نقش دارند (Eales and Brown, 1993; Leatherland, 1993). بنابراین اختلالات تیروئیدی می‌تواند به‌شدت تندرستی و بقای این موجودات را تحت تاثیر قرار دهد. مختل شدن فعالیت هورمون‌های تیروئیدی به‌وسیله‌ی ترکیبات زنوبیوتیک می‌تواند در مراحل مختلف ساخت هورمون، انتقال به سلول‌های هدف، اتصال به گیرنده‌های هورمون و متابولیسم آنها رخ دهد، در نتیجه عملکرد این هورمون‌ها را دچار اختلال نماید (Boas et al., 2006).

از سوی دیگر آزمایش میکرونوکلیوس<sup>۲</sup> یکی از رایج‌ترین روش‌های ژنوتوکسیسیستی است و به‌عنوان شاخصی برای آسیب‌های ژنتیک سلولی بیش از ۳۰ سال است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schmid, 1975; Heddle et al., 1991). این روش همچنین یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک ترکیباتی با تجمعات کم و در یک رابطه پاسخ وابسته به دوز می‌باشد (Gravato and Santos., 2003; Teles et al., 2003). علت استفاده از این تست آسان بودن روش کار، حساسیت کافی، سرعت بالا در آشکارسازی تغییرات ژنومی به علت اثرات کلاستوزنیک و اختلالات دوک‌های میتوزی در اثر سموم مختلف است. تحقیقات میکرونوکلی که در اصل با گونه‌های پستانداران توسعه پیدا کرد، به‌طور گسترده‌ای به‌منظور ارزیابی فعالیت ژنوتوکسیک مواد شیمیایی در ماهیان مورد استفاده

<sup>3</sup> Bisphenol A  
<sup>4</sup> Xenoestrogen

<sup>1</sup> Endocrine disrupting chemicals  
<sup>2</sup> Micronucleus test

### ۳-۲. نمونه برداری

نمونه برداری از ماهیان در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ به عمل آمد. نمونه‌ی روز صفر به منظور مقایسه با ماهیان کنترل در پایان دوره آزمایش بود. جهت نمونه برداری، پس از بیهوش نمودن و ثبت طول و وزن، از ساقه دم ماهیان به وسیله‌ی سرنگ ۲ml تیمار شده با هپارین خونگیری شد. سپس نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه در دور  $1000 \times g$  سانتریفوژ و پلاسما به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. نمونه‌های پلاسما تا زمان آنالیز در دمای  $80^{\circ}C$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای آنالیز میکرونوکلوئوس در سلول‌های اریتروسیت، یک قطره از خون گرفته شده به وسیله‌ی سرنگ مستقیماً بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده و گسترش خونی تهیه شد. اسلایدها ابتدا در معرض هوا خشک شدند، سپس به وسیله‌ی متانول به مدت ۱۰ دقیقه فیکس و برای آنالیز به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

### ۴-۲. سنجش هورمون‌های تیروئیدی

سنجش میزان هورمون‌های تیروئیدی پلاسما به روش رادیوایمونواسی و با استفاده از کیت T3, T4 RIA (Radioimmunoassay Kit) شرکت Immunotech کشور فرانسه انجام شد.

### ۵-۲. آنالیز میکرونوکلوئوس

اسلایدهای گسترش خونی فیکس شده، به وسیله‌ی محلول گیمسا ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی و در نهایت اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ آنالیز شدند (2006a Barsiene et al.,). فراوانی میکرونوکلوئوس‌ها در ۱۰۰۰ سلول اریتروسیت برای هر ماهی ثبت گردید (Oliveira et al., 2007).

### ۶-۲. آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS 16 استفاده شد. تمامی مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط تست Shapiro-wilk بررسی شد ( $P < 0.05$ ). از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-Way)

هورمون‌های تیروئیدی در فیزیولوژی ماهی (رشد، تولیدمثل، تکامل)، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر القایی بیس فنل آ بر ایجاد ناهنجاری‌های هسته‌ای و پتانسیل مختل کنندگی این آلاینده بر تعادل هورمون‌های تیروئیدی در ماهی شانک زردباله بوده است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱-۲. صید ماهی و دوره سازگاری<sup>۱</sup>

تعداد ۷۲ قطعه ماهی شانک زردباله نر نابالغ (میانگین وزنی  $12/1 \pm 133/7$  گرم) از خور زنگی و جعفری (از انشعابات خور موسی، ایران) صید شدند. ماهی‌ها پس از انتقال به سوله مرکز تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) به صورت تصادفی در ۶ تانک ۳۰۰ لیتری (۱۲ ماهی در هر تانک) با آب فیلتر شده دریا که توسط اشعه UV تیمار شده بود (شوری  $48 \pm 2\%$ ، pH  $8/2 \pm 0/2$ ، دمای  $25 \pm 2^{\circ}C$ ) و تحت سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی قرار داده شدند. ماهیان روزانه غذاهای می‌شدند و ۵۰ درصد از حجم آب هر تانک به صورت روزانه تعویض گردید. جهت سازگاری ماهی‌ها با شرایط جدید ۷ روز در نظر گرفته شد.

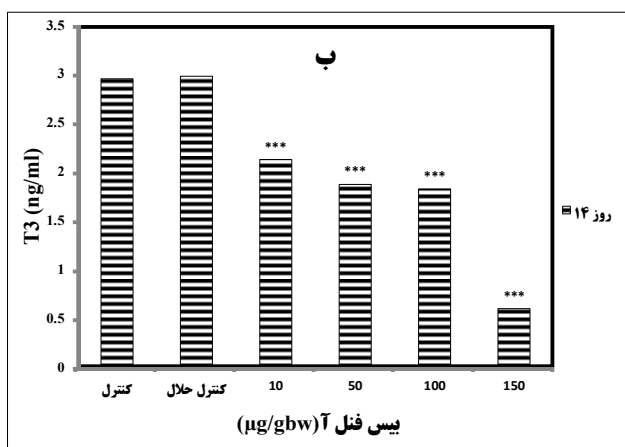
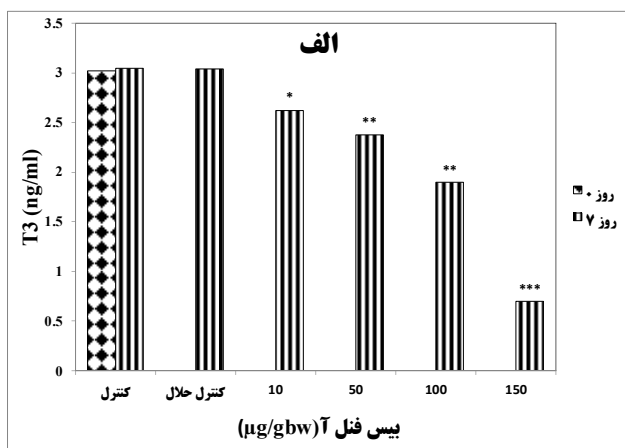
### ۲-۲. تزریق ماهیان

به منظور مواجهه ماهی شانک زردباله با ماده بیس فنل آ در مطالعه حاضر، از روش تزریق استفاده شد (Zhang et al., 2007). بدین منظور پس از بیهوش کردن با ۲-فنوکسی اتانول ۰/۲٪ (Merck, Germany)، ماهیان ۴ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و  $150 \mu g g^{-1} week^{-1}$  از BPA (Sigma-Aldrich Co) در طول ۲ هفته و به صورت دورن صفاقی تزریق شدند. تزریق‌ها در نصف دوز و دوبار در هفته انجام پذیرفت (۰/۲-۰/۱ میلی لیتر به ازای هر ماهی). گروه کنترل حلال<sup>۲</sup> تنها میزان معینی (حدود ۰/۱ میلی لیتر) از حلال (روغن نارگیل) را دریافت کردند در حالی که بر روی ماهیان کنترل هیچگونه تزریقی صورت نگرفت.

<sup>۱</sup> Acclimation period

<sup>۲</sup> Solvent control

با این حال گروه کنترل حلال که فقط روغن نارگیل دریافت کرده بودند، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری را در سطوح هورمون تیروکسین پلازما پس از ۷ و ۱۴ روز از در معرض قرارگیری نشان نداد ( $P < 0/05$ ). همچنین در یک روند معکوس، کاهش معنی‌داری در سطوح T3 پلاسمای ماهیان تیمار شده با غلظت‌های مختلف از BPA در مقایسه با ماهیان کنترل پس از ۷ روز از در معرض قرارگیری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۲الف). این کاهش در روز ۱۴ پس از تزریق بارزتر بود ( $P < 0/001$ ) (شکل ۲ب). حالی‌که تغییر معنی‌داری در میزان T3 پلاسمای خون ماهیان گروه کنترل در طول دوره آزمایش مشاهده نشد. همچنین هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در سطوح هورمون‌های تیروئیدی نمونه روز ۰ در مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۷ و ۱۴ مشاهده نشد.

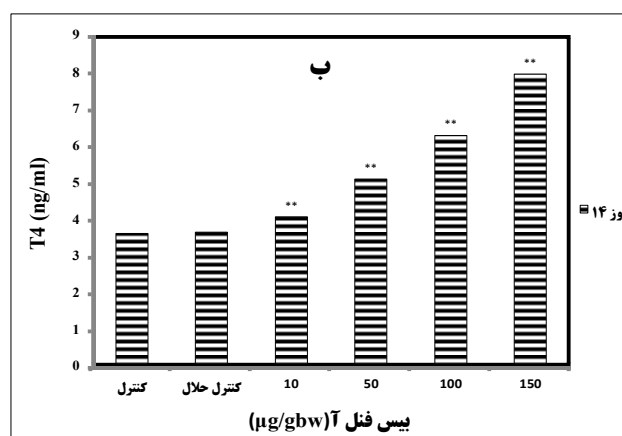
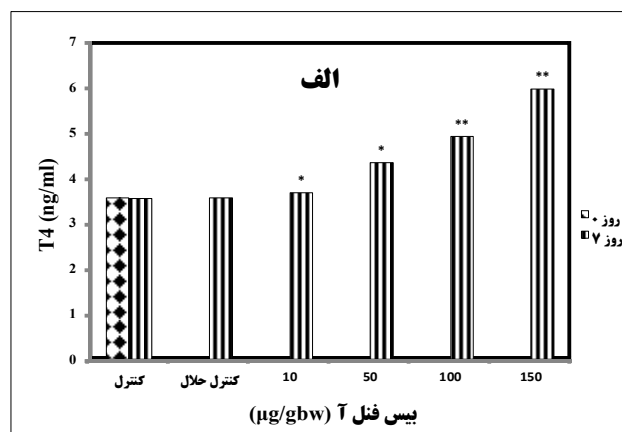


شکل ۲: (الف) غلظت T3 در پلاسمای جنس نر ماهیان شانک زردباله در ارتباط با غلظت‌های مختلف BPA بعد از ۷ روز از در معرض‌گذاری. (ب) غلظت T3 در پلاسمای جنس نر ماهیان شانک زردباله در ارتباط با غلظت‌های مختلف بعد از ۱۴ روز از در معرض قرارگیری به BPA. (\*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0/05$ . (\*\*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0/01$ . (\*\*\*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0/001$ .

ANOVA به‌منظور تعیین معنی‌داری اثر غلظت‌های مختلف، زمان و برهمکنش آن‌ها استفاده گردید. سپس با استفاده از پس‌آزمون دانکن معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مشخص گردید.

### ۳. نتایج

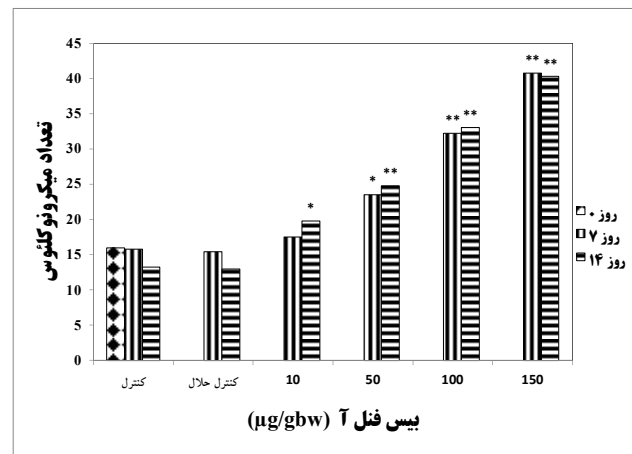
سطوح هورمون‌های تیروئیدی ماهی شانک زردباله به‌وسیله‌ی غلظت‌های متفاوت از BPA پس از ۷ و ۱۴ روز از در معرض‌گذاری تحت تأثیر قرار گرفت. برطبق شکل ۱- الف سطوح T4 پلاسمای ماهیان تیمار شده افزایش معنی‌داری را در یک رفتار وابسته به غلظت، در پاسخ به BPA پس از ۷ روز از در معرض قرارگیری نشان داد ( $P < 0/01$ ). این پاسخ وابسته به دوز به‌طور مشهودتر و معنی‌دارتر پس از گذشت ۱۴ روز از در معرض قرارگیری به BPA در شکل ۱- ب نشان داده شده است ( $P < 0/001$ ).



شکل ۱: (الف) غلظت T4 در پلاسمای جنس نر ماهیان شانک زردباله در ارتباط با غلظت‌های مختلف BPA بعد از ۷ روز از در معرض‌گذاری. (ب) غلظت T4 در پلاسمای جنس نر ماهیان شانک زردباله در ارتباط با غلظت‌های مختلف BPA در روز ۱۴ بعد از در معرض قرارگیری. (\*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0/05$ . (\*\*) بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0/001$ .

همکاران (۲۰۰۹) اثر نونیل فنل بر تعادل هورمون‌های تیروئیدی در ماهی *Carassius auratus* را به روش تزریق درون صفاقی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در سطوح  $T_4$  پلاسمای ماهیان تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل بود، ولی اثر معنی‌داری بر غلظت  $T_3$  مشاهده نشد. به‌علاوه Sciarrillo و همکاران (۲۰۱۰) با تزریق درون صفاقی نونیل فنل به جنس نر سوسمار *Podarcis sicula* نشان دادند که در معرض قرار گیری این خزنده با نونیل فنل موجب کاهش سطوح هورمون‌های  $T_4$ ،  $T_3$  و TSH آن می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر McCormick و همکاران (۲۰۰۵) با در معرض گذاشتن سالمون اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) با ۴- نونیل فنل، شاهد کاهش معنی‌داری در سطوح هورمون‌های  $T_3$  و  $T_4$  پلاسمای این ماهی بودند. نتایج این تحقیق نیز به‌طور آشکاری کاهش معنی‌داری را در سطوح  $T_3$  پلاسمای ماهیان و در روندی معکوس با غلظت و زمان نشان می‌دهد. اگرچه این کاهش حتی در کمترین غلظت از BPA مشاهده شد (شکل ۳ و ۴)، ولی سطوح  $T_4$  در یک رفتار وابسته به غلظت‌های مختلف از BPA به‌طور مثبت و معنی‌داری افزایش پیدا کرد (شکل ۱). با این حال به‌طور کلی می‌توان استدلال نمود که همبستگی مشخصی بین این تغییرات که قابل مقایسه با مکانیسم‌های فیدبکی که سطوح وابسته از هورمون‌ها را در ارتباط با محور تیروئید تنظیم می‌کند وجود ندارد. پیش از این نشان داده شده بود که BPA به دلیل شباهت ساختاری با هورمون‌های تیروئیدی قادر به ایجاد اختلال در عملکرد این هورمون‌ها است، بدین صورت که به‌صورت آنتاگونیستیک مانع از رونویسی ژن‌هایی می‌شود که به‌وسیله‌ی فرم فعال هورمون‌های تیروئیدی ( $T_3$ ) القا می‌گردد و در مقابل رونویسی ژن‌هایی که بوسیله  $T_3$  سرکوب می‌گردد را القا می‌نماید (Moriyama et al., 2002). در شرایط عادی هماهنگی دقیقی بین تولید، آزادسازی و حذف هورمون‌های تیروئیدی وجود دارد و اتصال بسیار قوی این هورمون‌ها به پروتئین‌های متصل شونده همانند یک منبع ذخیره‌ای برای هورمون‌های تیروئیدی در خون و برخی اندام‌ها همانند مغز و کبد عمل می‌کند. مطالعات متعدد نشان داده است که BPA می‌تواند با هورمون‌های تیروئیدی در اتصال به پروتئین‌های حامل این هورمون‌ها در خون (ترنسپرتین<sup>۱</sup> و گلوبولین<sup>۲</sup>) رقابت کند. برای مثال Meerts و همکاران (۲۰۰۰)

میانگین فراوانی میکرونوکلئوس در گلبول‌های قرمز ماهی شانک زردباله در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از مواجهه با BPA در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که از نمودار پیداست BPA باعث القای میکرونوکلئوس در رفتار وابسته به غلظت گردیده است. در پایان هفته اول به استثنای تیمار  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  بقیه غلظت‌ها باعث افزایش معنی‌داری در فراوانی ریزهسته‌ها در مقایسه با گروه کنترل شده است ( $P < 0.01$ ). این افزایش در پایان هفته دوم نیز کاملاً مشخص است ( $P < 0.001$ ). به‌طوری‌که در این زمان حتی در کمترین غلظت نیز افزایش معنی‌داری را در فراوانی ریزهسته‌ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌کنیم. با این حال گروه کنترل و کنترل حلال اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با نمونه روز صفر نشان ندادند. روزهای ۷ و ۱۴ نیز اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.



شکل ۳: میانگین فراوانی ریزهسته‌های القاشده در گلبول‌های قرمز ماهی شانک زردباله در مواجهه با غلظت‌های مختلف از BPA در روزهای ۷ و ۱۴ پس از در معرض قرارگیری با این ماده. (\*\*بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0.01$ ). (\*بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در  $P < 0.05$ ).

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر اولین گزارش از تأثیر بیس فنل آ بر تعادل هورمون‌های تیروئیدی و ایجاد آسیب سلولی در ماهی شانک زردباله است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که BPA قادر به ایجاد تغییرات معنی‌داری در سطوح هورمون‌های تیروئیدی در جنس نر نابالغ ماهی شانک زردباله است. به‌طور کلی تاکنون مطالعات محدودی درباره اثرات BPA و آلکیل فنل‌ها بر تعادل هورمون‌های تیروئیدی صورت گرفته است. Zaccaroni و

<sup>1</sup> Transthyretin

<sup>2</sup> Thyroxine-binding globulin (TBG)

مواجهه با استرادیول گزارش کردند. بنابراین به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم TPO دلیل احتمالی افزایش T<sub>4</sub> ماهی شانک زردباله تیمار شده با BPA باشد. همان‌طور که گفته شد عمده‌ترین میزان T<sub>3</sub> موجود در بافت‌ها از تبدیل T<sub>4</sub> به T<sub>3</sub> بوسیله حذف یک ید از حلقه خارجی تیروزین تحت تأثیر آنزیم 5' - مونودی‌ویدیناز (5'-MDA) ساخته می‌شود (Becker, 2001). در نتیجه اختلال در فعالیت این آنزیم میزان تبدیل T<sub>4</sub> به T<sub>3</sub> را تحت تأثیر قرار خواهد داد. قبلاً نشان داده شده که استرادیول قادر است فعالیت آنزیم 5'-MDA را در ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*) کاهش دهد (Okimoto et al., 1991). همین‌طور Adams و همکاران (۲۰۰۰) با تزریق درون صفاقی PCB به ماهی پهن آمریکایی (*Hippoglossoides platessoides*) کاهش در فعالیت آنزیم دی‌ویدیناز کبدی را نشان دادند. بنابراین گمان می‌رود BPA به طریق مکانیسمی مشابه فعالیت آنزیم 5'-MDA را کاهش داده که در نتیجه این عمل میزان تبدیل T<sub>4</sub> به T<sub>3</sub> را کاهش دهد. بنابراین کاهش در میزان T<sub>3</sub> در ماهی شانک زردباله در این مطالعه ممکن است در نتیجه تغییر در همئوستازی یا عملکرد این آنزیم در مواجهه با BPA باشد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر BPA موجب القای میکرونوکلتوس در گلبول‌های قرمز ماهی شانک زردباله شده است که نشان‌دهنده پتانسیل بالای BPA در ایجاد سمیت سیتوژنتیکی است. مطالعات متعددی نیز پیش از این درباره اثر القایی ترکیبات زنوبیوتیک بر تولید میکرونوکلتوس صورت گرفته است. در تحقیقی بر روی ماسل آبی نشان داده شده که در معرض‌گذاری ماسل آبی با BPA موجب ایجاد میکرونوکلتوس در سلول‌های آبشش این موجود می‌شود (Barsien et al., 2006b). همچنین Johnson و Parry (۲۰۰۸) با بررسی اثر القایی BPA بر ایجاد میکرونوکلتوس در رشته سلول‌های لیمفوبلاستوئید انسانی و رشته سلول‌های V79 موش بزرگ چینی ثابت کردند که BPA با تغییر عملکرد میکروتوبول‌ها و اثر بر دوک‌های میتوزی باعث القای میکرونوکلتوس در روند وابسته به دوز می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، Teles و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که نونیل فنل باعث القای میکرونوکلتوس در گلبول‌های قرمز ماهی خاردار (*Dicentrarchus labrax* L.) می‌شود. همین‌طور Oliveira و همکاران (۲۰۰۷) القای وابسته به دوز میکرونوکلتوس را در سلول‌های گلبول‌های قرمز ماهی *Liza aurata* در مواجهه با فنانترین گزارش کردند. در مطالعه حاضر نیز همان‌طور که در

نشان دادند که BPA می‌تواند پیوستگی ضعیف‌تری با پروتئین TTR نسبت به T<sub>4</sub> در شرایط آزمایشگاهی داشته باشد. با این حال در معرض قرارگیری‌های طولانی‌مدت با غلظت‌های پایین آن نیز می‌تواند اثرات مخربی به‌همراه داشته باشد (Goodman et al., 2009; Vandenberg et al., 2009). همچنین Yamauchi و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که ممانعت BPA از اتصال T<sub>3</sub> به TTR بسیار قوی‌تر از این محدودیت در اتصال T<sub>3</sub> به گیرنده‌های آن است. در مطالعه‌ای دیگر، Marchesini و همکاران (۲۰۰۸) اتصال BPA با TTR و TBG را اثبات کردند. Ishihara و همکاران (۲۰۰۲) نیز قدرت بازدارندگی ۴ ترکیب زنواستروژن دی-اتیل استیل‌بسترول<sup>۱</sup>، اکتیل فنل، نونیل فنل و BPA در اتصال T<sub>3</sub> نشاندار [125I] به پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی جوجه مرغ، قورباغه و سالمون را بررسی نمودند که نتیجه‌ی مطالعه آن‌ها بیانگر قدرت بازدارندگی بالای BPA در اتصال این هورمون به پروتئین‌های حامل آن در خون این موجودات بود. بنابراین افزایش در مقادیر T<sub>4</sub> پلاسمای ماهیان شانک تیمار شده ممکن است ناشی از کاهش انتقال این هورمون به بافت‌های هدف باشد و با توجه به اینکه قسمت اعظم تولید T<sub>3</sub> از T<sub>4</sub> در بافت‌های مختلف ایجاد می‌شود این ممانعت در انتقال T<sub>4</sub> کاهش سطوح T<sub>3</sub> را در پی داشته باشد. از طرف دیگر Schmutzler و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که نونیل فنل اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم تیروئید پراکسیداز<sup>۲</sup> (TPO) در شرایط آزمایشگاهی دارد. TPO آنزیمی است که یددار شدن تیروزین را کاتالیز می‌کند. دو دی‌یدوتیروئین (DIT) به وسیله TPO به هم متصل می‌شوند و هورمون T<sub>4</sub> را تولید می‌کنند. بیشترین قسمت T<sub>3</sub> موجود در خون از تبدیل T<sub>4</sub> در کبد به وسیله آنزیم دی‌ویدیناز ساخته می‌شود، اگرچه مقداری هم می‌تواند به‌همین طریق در غده تیروئید از T<sub>4</sub> قبل از آزادسازی به درون خون ساخته شود (Di Giulio and Hinton, 2008). بنابراین افزایش در فعالیت این آنزیم هم‌راستا با افزایش تولید T<sub>4</sub> خواهد بود. Sinha و همکاران (۱۹۹۱) پس از در معرض‌گذاری گربه‌ماهی *Clarias batrachus* به اندوسولفان افزایش فعالیت آنزیم TPO را هم‌راستا با افزایش سطوح T<sub>4</sub> و کاهش T<sub>3</sub> را با افزایش زمان گزارش کردند. همین‌طور Lima و همکاران (۲۰۰۶) افزایش معنی‌داری را در فعالیت آنزیم TPO در موش‌های طبیعی و بدون تخمدان پس از

<sup>1</sup> Diethylstilbestrol

<sup>2</sup> Thyroid peroxidase

- maintenance in laboratory. *Acta Zoologica Lithuanica*, 16: 191-197.
- Barsiene, J.; Syvokiene, J.; Bjornstad, A., 2006b. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Aquatic Toxicology*, 78: 105-108.
- Becker, K.L., 2001. Principles and practice of endocrinology and metabolism: Lippincott Williams and Wilkins, 2477 p.
- Boas, M.; Feldt-Rasmussen, U.; Skakkebaek, N.E.; Main, K.M., 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology*, 154: 599-611.
- Bolognesi, C.; Perrone, E.; Roggieri, P.; Sciutto, A., 2006. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. *Marine Environmental Research*, 62: 287-291.
- Damstra, T.; Page, S.; Herrman, J.; Meredith, T., 2002. Persistent organic pollutants: Potential health effects? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 56: 457-465.
- Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E., 2008. The toxicology of fishes. New York: Taylor and Francis, 1101 p.
- Eales, J.G.; Brown, S.B., 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3: 299-347.
- European Commission., 1997. Environment and climate research programme DG XII of the report of European Commission. Proceedings EUR17549. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, London, UK.
- Goodman, J.E.; Witorsch, R.J.; McConnell, E.E.; Sipes, I.G.; Slayton, T.M.; Jetal, Y.C., 2009. Weight-of-evidence evaluation of reproductive and developmental effects of low doses of bisphenolA. *Critical Reviews in Toxicology*, 39: 1-75.
- شکل ۳ دیده می‌شود BPA باعث القای میکرونوکلئوس در گلبول‌های قرمز ماهی شانک زردباله در رفتار وابسته به دوز شده است. این افزایش میکرونوکلئوس و تغییرات معنی‌دار هورمون‌های تیروئیدی در زمان‌های کوتاه در مواجهه با BPA نشان داد که این عوامل می‌توانند بیومارکرهای مناسبی برای بررسی وضعیت آلودگی محیط و سلامت آبزیان و خصوصاً ماهیان باشند.
- ### ۵. سپاسگزاری
- از زحمات تمامی پرسنل محترم مرکز تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) به خصوص مهندس صحرائیان و مسئول محترم این مرکز آقای مهندس نجف آبادی به خاطر کمک‌های تکنیکی و فراهم آوردن امکان انجام این پژوهش در آن مرکز کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.
- ### منابع
- Adams, B.A.; Cyr, D.G.; Eales, J.G., 2000. Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 127: 367-378.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343 (2-3): 121-135.
- Al-Sabti, K., 1995b. Detection of triploidy in fish using the cytokinesis-blocked method for erythrocyte and hepatic cells. *Cytobios*, 82 (330): 181-187.
- Amaral Mendes, J., 2002. The endocrine disruptors: A major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 781-788.
- Barsiene, J.; Rybakovas, A., 2006a. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus edulis* from the Baltic coast and after 1-3-day

- Lactational Exposure to Bisphenol A on Thyroid Status in F1 Rat Offspring. *Industrial Health*, 2005 (43): 685–690.
- Kohler, A.; Ellesat, K., 2008. Nuclear changes in blood, early liver anomalies and hepatocellular cancers in flounder (*Platichthys flesus* L.) as prognostic indicator for a higher cancer risk? *Marine Environmental Research*. In: PRIMO 14, 14 International Symposium Pollutant Responses in Marine Organisms, 6–9th May 2007, Florianopolis/SC, Brazil, 8 pp.
- Leatherland, J.F., 1993. Field observations on reproductive and developmental dysfunction in introduced and native salmonids from the Great Lakes. *Great Lakes Research*, 19: 737–751.
- Legler, J.; Brouwer, A., 2003. Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environment International*, 29: 879–85.
- Lima, L.P.; Barros, I.A.; Lisboa, P.C.; Araujo, 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: 653–659.
- Malene, B.; Ulla, F.R.; Niels, E.; Skakkebaek and Katharina, M. M., 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology*, 154: 599–611.
- Marchesini, G.R.; Meimaridou, A.; Haasnoot, W.; Meulenbergh, E.; Albertus, F.; Mizuguchi, M., 2008. Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232: 150–160.
- Marlasca, M.J.; Sanpera, C.; Riva, M.C.; Sala, R. and Crespo, S., 1998. Hepatic alterations and induction of micronuclei in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a textile industry effluent. *Histology and Histopathology*, 13 (3): 703–712.
- Matthiessen, P., 2003. Historical perspective on endocrine
- Gravato, C.; Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 352–358.
- 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: 147–151.
- Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, P.h.; Mac Gregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277–291.
- Hesp, S.A.; Potter, I.C.; Hall, N.G., 2004. Reproduction biology and protandrous experimental or field exposure in the gills and the hermaphroditism in *Acanthopagrus latus*. *Environmental Biology of Fishes*, 70: 252–272.
- Howdeshell, K.L.; Hotchkiss, A.K.; Thayer, K.A.; Vandenberg, J.G.; vom Saal, F.S., 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, 401: 763–764.
- Hutchinson, T.H.; Brown, R.; Brugger, K.E.; Campbell, P.M.; Holt, M.; Lange, R., 2000. Ecological risk assessment of endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 108: 1007–14.
- Ishihara, A.; Sawatsubashi, S.; Yamauchi, K., 2003. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and to thyroid hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 199: 105–117.
- Johnson, G.E.; Parry, E.M., 2008. Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research*, 651: 56–63.
- Kenichi, K.; Muneyuki, M.; Rui-Sheng, W.; Megumi, S.; Soichiro, S.; Takeshi, H., 2005. Effects of in Utero and



- Environmental Safety, 63: 343-52.
- Sa, R.; Pousao-Ferreira, P.; Oliva-Teles, A., 2006. Effect of dietary protein and lipid levels on growth nickel on glycogen reserves and protein levels in and feed utilization of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 12: 310-321.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15.
- Schmutzler, C.; Hamann, I.; Hofmann, P.J.; Kovacs, G.; Stemmler, L.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Ambrugger, P.; Gruters, A.; Seidlova-Wuttke, D., 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: 95-102.
- Sciarrillo, R.; Capaldo, A.; Valiante, S.; Gay, F.; Sellitti, A.; Laforgia, V.; De Falco, M., 2010. Thyroid hormones as potential early biomarkers of exposure to nonylphenol in adult male lizard (*Podarcis sicula*). *The Open Zoology Journal*, 3: 17-22.
- Segner, H., 2005. Developmental, reproductive, and demographic alterations in aquatic wildlife: Establishing causality between exposures to endocrine active compounds (EACs) and effects. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33: 17-26.
- Sinha, N.; Lal, B.; Singh, T., 1991. Effect of endosulfan on thyroid physiology in the freshwater catfish, *Clarias batrachus*. *Toxicology*, 67: 187-197.
- Teles, M.; Gravato, C.; Pacheco, M.; Santos, M.A., 2004. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to  $\beta$ -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere*, 57: 147-158.
- Teles, M.; Pacheco, M.; Santos, M.A., 2003. Anquilla anquilla L. liver ethoxyresorufin O-demethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene disruption in wildlife. *Pure and Applied Chemistry*, 75: 2197-2206.
- Meerts, I.A.T.M.; Zanden, J.J.V.; Luijckx, E.A.C.; Leeuwen-Boll, V.; Marsh, G.; Jakobsson, E., 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences*, 56: 95-104.
- McCormick, S.D.; ODea, 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: 280-288.
- Moriyama, K.; Tagami, T.; Akamizu, T.; Usui, T.; Saijo, M.; Kanamoto, N.; Hataya, Y.; Shimatsu, A.; Kuzuya, H.; Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87: 5185-5190.
- Okimoto, D.; Tagawa, M.; Koide, Y.; Grau, E.; Hirano, T., 1991. Effects of various adenohipophysial hormones of *Chum salmon* on thyroxine release in vitro in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 8: 567-573.
- Oliveira, M.; Pacheco, M.; Santos, M.A., 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. *Chemosphere*, 66: 1284-91.
- Pacchierotti, F.; Ranaldi, R.; Eichenlaub-Ritter, U.; Attia, S.; Adler, I.D., 2008. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. *Mutation Research*, 651: 64-70.
- Park, J-W.; Rinchar, J.; Liu, F.; Anderson, T.A.; Kendall, R.J.; Theodorakis, C.W., 2006. The thyroid endocrine disruptor perchlorate affects reproduction, growth, and survival of mosquitofish. *Ecotoxicology and*

- C.K.C., 2011. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and fresh water fish from Pearl River Delta, China. *Chemosphere*, 05.038.
- Wozniak, M.; Murias, M., 2008. Xenoestrogens: endocrine disrupting compounds. *ginekologii Polskiej*, 79: 785–790.
- Zaccaroni, A.; Gamberoni, M.; Mandrioli, L.; Sirri, R.; Mordenti, O.; Scaravelli, D.; Sarli, G.; Parmeggiani, A., 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: 3301-3306.
- Zhang, W.; Yang, J.; Wang, J.; Xia, P.; Xu, Y.; Jia, H.; Chen, Y., 2007. Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology*, 241: 84-91.
- and  $\beta$ -naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 98-107.
- Thibaut, R.; Porte, C., 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroids synthesis and metabolism pathways in fish. *Journal of Steroid Biochemistry*, 92: 485–94.
- Todorov, J.R.; Elskus, A.A.; Schlenk, D.; Ferguson, P.L.; Brownawell, B.J.; McElroy, A.E., 2002. Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) exposed to New York city sewage effluent. *Marine Environmental Research*, 54: 691–5.
- Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S.; Soto, A.M., 2009. Bisphenol-A and the great divide: are view of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1): 75–95.
- Wei, X.; Huang, Y.; Wong, M.H.; Giesy, J.P.; Wong,