تاثیرماده شبه استروژنی نونیل فنل بر تولید و تغییرات میزان پروتیین ویتلوژنین پلاسمای خون تاس ماهی ایرانی نابالغ به عنوان یک نشانگر زیستی

شیرین جمشیدی[۱]، محمدرضا کلباسی[۱*]، مجید صادقی زاده[۲] و محمد علی یزدانی ساداتی[۳]

[۱] گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران
[۲] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران
[۳] مرکز بین اللمللی تحقیقات ماهیان خاویاری گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۴- تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۷/۱۷)

چکیده

مطالعه حاضر اثرات ماده شبه استروژنی نونیل فنل بر تولید نابهنگام و تغییرات میزان پروتئین ویتلوژنین در تاسماهی ایرانی نابالغ را ثابت کرد. در این خصوص شناسایی، تخلیص و تغییرات میزان ویتلوژنین در پلاسمای خون ماهیان در معرض قرار گرفته با دوزهای متفاوت نونیل فنل در مقایسه با ماده استروژنی۱۷ بتا استرادیول، انجام شد. اندازه حقیقی این پروتئین بر اساس معادله رگرسیون خطی نشانگرهای پروتئینی و ژل فیلتراسیون ۴۲۰ کیلو دالتون تخمین زده شد. این پروتئین روی ژل پلی آکریل آمید دناتوره شده به شکل دایمر مشاهده گردید. به منظور تولید آنتی بادی پلی‌کلونال، ابتدا پروتئین کلیواژ شده ویتلوژنین (لیپوویتلین) که از تخمک تاسماهی ایرانی استخراج شده بود به خرگوش تزریق شد و پس از تولیدآنتی بادی، نمونه‌های پلاسما با روش وسترن بلات و الایزا مورد آزمون قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که تمامی گروه‌هایی که با دوز mg/kg ۱۰و۱۰۰ نونیل فنل تیمار شده بودند، روی تولید پروتئین ویتلوژنین تاثیر معنی‌دار داشته‌اند ($P<0.05$). اما میزان تغییرات ویتلوژنین در گروهی که حداقل دوز نونیل فنل (۱mg/kg) را دریافت کرده بود معنی‌دار نبوده است ($P>0.05$). این نتایج ضمن تایید اثرات منفی مواد شبه استروژنی بر روی تاسماهی ایرانی نشان داد که از این شاخص می‌توان به عنوان نشانگر زیستی حضور مواد شبه استروژنی در محیط‌های آبی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ویتلوژنین، نونیل فنل، تاسماهی ایرانی، ۱۷ بتا استرادیول.

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۱۲۲۶۲۵۳۱۰۱ فاکس: ۰۱۲۲۶۲۵۳۴۹۹ E-mail: kalbassi_m@modares. ac. ir

مقدمه

ویتلوژنین (*Vtg*) نوعی فسفوگلیکوپروتئین سرمی در جانوران ماده است که در مهره داران تخم گذاردر فرآیند شکل گیری زرده تخمک، نقش اساسی دارد. ویتلوژنین پیش ماده پروتئین زرده تخمک، در پاسخ به تولید ۱۷ بتا استرادیول ترشح شده از لایه فولیکولی تخمدان تولید می‌شود (Hiramatsu and Hara, 1996; Silverstand and Haux ,1995; Wallace, 1985). این پروتئین در تخمک به ۳ شکل پروتئین لیپوویتلین[1]، فسویتین[2] و بتاکامپونت[3] دیده میشود (Hiramatsu and Hara, 1996). بیشتر پروتئین زرده تخمک و لیپیدها از کلیواژ یک پیش مولکول که بخش عمده آن ویتلوژنین و مقدار کمی لیپیدهای سبک است؛ تشکیل می‌شود (Lindholst *et al.* 2000; Schneider, 1996; Servos, 1999; Tyler and Sumpter,1996; Wiegand 1996).

امروزه به پروتئین ویتلوژنین ماهی به عنوان نشانگر زیستی ترکیبات شبهه استروژنی در محیط‌های آبی توجه ویژه‌ای شده است. به صورت طبیعی، ویتلوژنین فقط در سرم جانورماده بالغ دیده می‌شود ولی جانور نر و وهمچنین ماهیام ماده نابالغ نیز زمانی که با استروژن‌های خارجی و یا موادی که نقش استروژن‌ها را بازی می‌کنند؛ مواجه باشند؛ این پروتئین را سنتز می‌کنند (Harries *et al.* 1997; Hiramatsu *et al.* 2002; Sumpter,1998).

دامنه وسیعی از مواد شمیایی ساخت بشر به محیط‌های آبی آزاد می‌شوند که شامل حشره کش‌های ارگانو کلرایدی، بی فنیل‌های پلی کلرینه (PCBs)، سورفکتانت‌ها، امولسی فایرها و دیگر مواد شیمیایی مثل فیتواستروژن‌ها و مایکواستروژن‌ها می‌باشند (Ahel *et al.* 1994a; Ahel *et al.* 1994b). آلکیل فنل‌ها به طور وسیعی در بسیاری از صنایع از جمله سورفکتانت‌ها و همچنین در صنایع پلاستیک سازی به عنوان آنتی اکسیدانت مصرف میشوند. نونیل فنل مونومر آلکیل فنل‌ها که در بسیاری از صنایع وجود دارد از ابتدای دهه ۴۰ میلادی در سراسر دنیا استفاده شده است وتحقیقات نشان داده است که وجود نونیل فنل به همراه دیگر تخریب کننده‌های سیستم غدد داخلی در محیط زیست می‌تواند تولید ویتلوژنین و برخی از پدیده‌های دیگر را مثل اختلال رشد لوله‌های اسپرمی (Gray and Metcalfe 1997)، کاهش زنده ماندن اسپرماتوزوآ (Jobling *et al.* 1996)، گسترش اندام جنسی بینابینی نر-ماده (Kawana *et al.* 2003)، را منجر شود.

هدف از مطالعه حاضردرک رفتار بیوشیمیایی پروتئین ویتلوژنین واندازه آن و تاثیر پذیری مقدار تولید آن در مواجه با عواملی خارجی مثل زنواستروژن‌ها (استروژن‌های خارجی) در ماهی خاویاری ایرانی به عنوان مهمترین پروتئین تاثیر گذار در سیکل تولید مثلی می‌باشد.

تاسماهی ایرانی دریای خزر به جهت بومی بودن از اهمیت ویژه‌ای در ایران برخوردار می‌باشد و هر ساله تعداد کثیری در مراکز تکثیر و پرورش شیلات استان‌های ساحلی دریای خزر تکثیر شده و به رودخانه‌های دریای خزر رها سازی می‌شود ولی با این حال تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری به جهت محدود بودن اکوسیستم‌ها، عواملی چون ساخت سدها، آلودگی آبها و صید بی رویه برای استحصال گوشت و تولید خاویار در معرض تهدید یا خطر انقراض قرار دارند. از این میان آلودگی‌ها علی الخصوص عوامل آلوده کننده اکوسیستم‌های آبی که توسط بشر به محیط رها سازی شده است از اهمیت ویژه‌ای برخوددار می‌باشند.

با توجه به گزارش حضور نونیل فنل در دریای خزر (Mortazavi *et al.* , 2012)، احتمال تاثیر آن بر سیکل تولید مثلی این ماهی متصور است. لذا این تحقیق تلاشی بر ارزیابی تاثیرات مقادیر متفاوت نونیل فنل (به عنوان ترکیبی شبه استروژنی) در مقایسه با ۱۷ بتا استرادیول (به عنوان ترکیبی کاملا استروژنی) در تاسماهی ایرانی دریای خزر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تیمارهای تحقیق و نحوه نمونه برداری

در این تحقیق ۶ تیمار متفاوت به شرح زیر بر روی تاس ماهیان جوان ایرانی یکساله در مرکز تکثیر و پرورش شهید دادمان گیلان، انجام شد. دمای آب ۱۸/۳ تا ۱۸/۵ و نگهداری ماهیان در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. به علت تاثیر مواد فیتو استروژنی که در غذا ممکن است وجود داشته باشند در مدت زمان عملیات تحقیق، تغذیه انجام نشد. اکسیژن محلول در آب بین ۱۸/۱ تا ۱۸/۶میلی‌گرم در لیتر بوده است. برای آزمایشات بیوشیمیایی از ۲۴ ماهی در هر تیمار استفاده شد: ۱- کنترل منفی اول شامل ماهیان تزریق شده با روغن بادام زمینی (به عنوان ماده ناقل روغنی که می‌بایست خاصیت تغذیه‌ای داشته باشد) به میزان ۲ میلی

[1] Lipovitellin
[2] Phosvitin
[3] ß-component

لیتر بر کیلو گرم وزن ماهی در هفته. ۲ - کنترل منفی دوم شامل ماهیان بدون هیچگونه تزریق. ۳-کنترل مثبت شامل ماهیان تزریق شده با ۵ میلی گرم برکیلوگرم هورمون ۱۷ بتا استرادیول. ۴-تیمار اصلی اول شامل ماهیان تزریق شده با ۱ میلی گرم بر کیلو گرم وزن ماهی نونیل فنل (Sigma Aldrich) ۵- تیمار اصلی دوم شامل ماهیان تزریق شده با۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن ماهی نونیل فنل. ۶-تیمار اصلی سوم شامل ماهیان تزریق شده با۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن ماهی نونیل فنل. ماهیان هر تیمار در تانکهای مجزای ۵۰۰ لیتری نگهداری و آزمایش با سه تکرار انجام پذیرفت. مواد مورد استفاده در تیمارهای اصلی در ۲ میلی لیتر روغن بادام زمینی (به ازای کیلوگرم وزن ماهی) محلول ودر زمانهای موردنظر تزریق گردید. تزریق‌ها در روز صفر، هفتم، چهاردهم پس از وزن کردن ماهی انجام شده و ۷۲ ساعت پس از تزریق آخر، با استفاده از سرنگ‌های آغشته به هپارین خون گیری انجام پذیرفت. وزن ماهیان مورد آزمایش ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ گرم بوده است. پلاسمای خون پس از قرار دادن نمونه‌های خون به مدت یک شبانه روز در یخچال۴ درجه سانتی گراد جدا شده ودر دمای ۸۰-درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها ذخیره سازی شدند.

شناسایی و تعیین وزن مولکولی پروتئین پلاسمای خون در نمونه‌های تیمار شده

به منظور ردیابی پروتئین‌های با وزن مولکولی متفاوت در پلاسمای خون ابتدا پلاسمای خون نمونه‌های تیمار شده با هورمون۱۷ بتا استرادیول و نونیل فنل به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده وسیستم بافری تریس- گلایسین، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد (Mostafaie, 2000). سپس ژل با رنگ کوماسی آبیR250 در محلول اتانول، اسید استیک و آب مقطر به نسبت‌های (۴:۱:۵) رنگ آمیزی شد. ارزیابی وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از نشانگر پروتئینی با دامنه وسیع (۱۰-۱۷۰ کیلو دالتون) (Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder SM#0671) صورت پذیرفت.

برای ردیابی اندازه پروتئین ویتلوژنین ابتدا پلاسماهای کنترل مثبت حاوی ویتلوژنین در آب مقطر دیالیز شده و با سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد. رسوب مذکور در آب مقطر حل شده و مجداد با شرایط فوق سانتریفیوژ ودر NaCl نیم مولار حل شدند. سپس محلول حاصل ازستون ژل فیلتراسیون (G200) حاوی بافر فسفات یک صدم مولارو نمک طعام نیم مولار با pH برابر ۷/۵، عبور داده شد. نشانگر مورد استفاده برای این مرحله پروتئین تیروگلوبولین گاوی با وزن مولکولی ۶۷۰ کیلو دالتون و گاماگلبولین گاوی برابر۱۵۸کیلو دالتون بوده است. اندازگیری پروتئین در جذب ۲۸۰ نانومترانجام شد. طول ستون ۱۰۰ سانتی متر و قطر آن کمتر از۲ سانتی متر و سرعت جریان عبوریک میلی لیتر در دقیقه است. زمان کل کروماتو گرافی تقریبا ۵ ساعت بود. سپس با استفاده از زمان خارج شدن پروتئین و طول ستون ژل فیلتراسیون کروماتوگرام آن رسم شد. اندازه پروتئین علاوه بر زمان خارج شدن از ستون ژل فیلتراسیون و طول آن، با سنجش نشانگرهای وزن مولکولی و تحرک نسبی آنهابه صورت تقریبی روی ژل تعیین شد ومعادله رگرسیون خطی رسم شد سپس بر اساس فاصله پیموده شده باند پروتئینی ویتلوژنین و قرار دادن آن در معادله حاصل، اندازه پروتئین ویتلوژنین در ماهی خاویاری ایرانی تعیین شد. چون تعداد باندهای نشانگر پروتئینی روی ژل بیشتر بود؛ گراف و معادله رگرسیون برای تخمین دقیق تر اندازه پروتئین ویتلوژنین با استفاده از آن رسم شد.

جدا سازی پروتئین لیپوویتلین با استفاده از روش مشاهده روی ژل پلی آکریل آمید وGel preparative

به منظور ردیابی پروتئین ویتلوژنین در خون ماهیان تیمار شده، ابتدا لیپوویتلین (پروتئین کلیواژ شده ویتلوژنین در تخمک) پس از الکتروفورز بروی ژلSDS-PAGE جداسازی و سپس از روی ژل تخلیص شد (Zhang, 2011). در این خصوص تخمک‌های رسیده ماهی خاویاری ایرانی پس از رسیده شدن و قبل از لقاح جمع آوری شدندو در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور استخراج لیپوویتلین تخمک‌ها هموژنایز شده و با ۳ حجم بافر Tris-Hcl با pH:8 شامل نمک طعام ۲ درصد و نیترید سدیم یک درصد مخلوط شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰g برای ۱ ساعت سانتریفیوژ شدند (Zhang, 2011). مایع رویی جمع‌آوری شده و با کاغذ واتمن شماره ۲صاف شدند. نمونه پروتئین لیز شده تخمک روی ژل SDS-PAGE ۸ درصد رانده شده و پروفایل باندی ایجاد شده با نشانگر پروتئینی شرکت (Fermentas SM#0671) مقایسه شد.

باند کلیواژ شده ویتلوژنین یعنی لیپوویتلین شناسایی و پس از شناسایی و با روش Gel preparative، جدا سازی گردید. در این خصوص ابتدا مخلوط لیز شده پروتئین تخمک ماهی خاویاری روی ژل ۶ درصد پلی آکریل آمید

(SDS-PAGE) رانده شده وباند مورد نظر از روی ژل بریده شدو داخل ۳ ml بافر لیزمذکور به مدت یک شبانه روز در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شده تا پروتئین از داخل ژل به درون بافر راه یابد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۸۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژشده و مایع سطحی که شامل پروتئین مذکور بود؛جدا گردید. صحت وجود پروتئین مذکور با انتقال محصول نهایی بروی ژل آکریل آمید ۸٪ تایید گردید و برای تولید آنتی بادی پلی کلونال مورد استفاده قرار گرفت.

تولید آنتی بادی پلی کلونال با استفاده ازلیپوویتلین تخمک تاسماهی ایرانی

ابتداآنتی ژن (پروتئین) تولید شده حاصل از مرحله قبل با غلظت ۱/۵ میلی گرم بر کیلو گرم در ۱میلی لیتر تریس ۵۰ میلی‌مولار pH = 8 محلول شده و به همراه یک میلی لیتر ادجوانت فروند کامل در ناحیه گردنی خرگوش نر به صورت زیر جلدی تزریق شد. تزریق دوم به مانند تزریق اول ولی با غلظت ۰/۵ میلی گرم پروتئین به فاصله ۱۰ روزپس از تزریق اول در همان حجم تریس و ادجوانت فروند ناقص تکرار پیدا کرد. خون گیری از سرخرگ مارژینال گوش خرگوش پس از ۷ روز انجام شد. پلاسمای خون پس از نگهداری نمونه خون در دمای ۴ درجه سانتی گراد و انجام سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ g جمع آوری شد. پلاسمای خون پس از جدا سازی تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۸۰- سانتی گرادذخیره سازی شدند.

ارزیابی عملکرد آنتی بادی به روش وسترن بلاتینگ

برای اثبات عملکرد صحیح آنتی بادی تولید شده بر علیه لیپوویتین در بدن خرگوش از واکنش وسترن بلاتیگ استفاده شد. پروتئین مورد نظر در نمونه‌های تیمار روی ژل SDS-PAGE رانده شده وپس از تفکیک توسط جریان الکتریکی به کاغذ نیتروسلولوز منتقل شد. بقیه روش کار طبق روش بلاتینگ در مقاله Shimizu و همکاران در سال ۲۰۰۲ مورد استفاده واقع شد. ماهیان نر بالغ (بدون تیمار) به عنوان کنترل منفی در این روش بکار رفت.

سنجش میزان ویتلوژنین به روش ساندویچ الایزا (Enzyme-linked Immuno-sorbant Assay)

از پروتئین لیپوویتلین که از تخمک استخراج و تخلیص شده بود، یک رقیق سازی از غلظت ۲ نانوگرم بر میلی لیتر تا ۴۰۹۶ نانوگرم بر میلی لیتر تهیه و جذب هر کدام از آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر گرفته شد؛ سپس داده‌های حاصل از جذب نمونه‌های تیمار شده داخل فرمول فوق قرار داده شد و نهایتا عدد حاصل به عنوان غلظت نهایی در نظر گرفته شد. میزان ویتلوژنین در پلاسما توسط روش ساندویچ- الایزا مورد آزمون قرار گرفت. روش فوق از پروتکل Zhang و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت و در انتها جذب واکنش در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا تعیین شد. اعداد حاصل در فرمول بدست آمده از رقیق سازی پروتئین لیپوویتلین، قرار داده شد و سپس غلظت هر نمونه مشخص شد.

آنالیز آماری

جهت محاسبات آماری از برنامه SPSS نسخه۱۸ استفاده شد. آزمون نرمالینی داده‌ها به وسیله آزمون کولموگروف اسمیرنف بررسی شدو برای مقایسه کلی بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه استفاده شد (one-way ANOVA). برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون توکی در سطح ۹۵درصد اطمینان استفاده شد. نتایج به شکل میانگین±خطای معیار میانگین (SEM) نشان داده شده است. نمودار توسط نرم افزار GraphPad prism 5 رسم شده است.

نتایج

نتایج حاصل ازSDS-PAGE پلاسمای خون وتخمک لیز شده تاسماهی ایرانی به روش ژل فیلتراسیون

وزن مولکولی پروتئین ویتلوژنین بالای ۲۰۰ کیلو دالتون است و بالاتر از آن هم پروتئین دیگری در پلاسمای خون مشاهده نشد. این پروتئین در محدوده بالای، بالاترین نشانگر پروتئینی یعنی۱۷۰ کیلو دالتون، نشانگر پروتئینی Fermentas (شکل۱الف) و یا مابین باند ۱۵۰ کیلو دالتونی و ۲۵۰ کیلو دالتونی نشانگر پروتئینی BioRad (شکل۲ الف) قرار گرفته است. در این شکل‌ها تفاوت تولید این پروتئین در کنترل مثبت و تیمار ۱۰۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی و تیمار بدون تزریق مشخص است. همان طور که از این شکل‌ها بر می‌آید در معرض بودن با ۱۷ بتا استرادیول و نونیل فنل منجر به تولید این پروتئین در پلاسمای خون ماهی شده است. همچنین از طریق این شکل‌ها مشخص شد که نونیل فنل توانایی القای ساخته شدن پروتئین ویتلوژنین را دارا می‌باشد. با توجه به نموداربدست آمده از ژل فیلتراسیون (شکل۳) و مقایسه با دو نشانگر۶۷۰ و ۱۵۸ کیلو دالتونی و

همچنین بر اساس تحرک نسبی هر کدام از باندهای نشانگر پروتئینی و لگاریتم وزن مولکولی آنها به کیلو دالتون، وزن مولکولی پروتئین ویتلوژنین بر اساس معادله رگرسیون خطی (شکل۱ب) و فاصله پیموده شده باند ویتلوژنین روی ژل محاسبه گردید. تحرک نسبی باندهای کوچکتر بیشتر است؛ بر این اساس وزن پروتئین ویتلوژنین در ماهی خاویاری ایرانی، ۴۲۰ کیلو دالتون محاسبه شد که به فرم دایمر ۲۱۰ کیلو دالتونی در ژل SDS-PAGE (شکل۱ و ۲ الف) دیده می‌شود. شکل (۲ ب) نشان دهنده قطعات کلیواژ شده پروتئین ویتلوژنین در تخمک است که با محاسبات انجام شده، اندازه پروتئین لیپوویتلین ۱۲۵ کیلو دالتون محاسبه شد و همچنین از مقایسه قطعه کلیواژ شده تخمک و ویتلوژنین در پلاسمای خون، تفاوت اندازه آنها در دو بافت تخمک و پلاسمای خون نشان داده شد (شکل۲ ج).

نتایج حاصل از تولید آنتی بادی پلی کلونال، وسترن بلاتینگ و الایزا

روش وسترن بلاتینگ به منظور ردیابی این پروتئین در پلاسماهای افراد تیمار شده با نونیل فنل و بتا استرادیول استفاده شد؛ شکل (۴) نتیجه واکنش آنتی بادی اولیه تولید شده با آنتی ژن (پروتئین) تایید محمکی بر وجود قطعی این پروتئین در پلاسمای خون ماهیان مورد تیمار می‌باشد؛ در بلاتینیگ از پلاسمای خون ماهی نربالغ برای کنترل منفی استفاده شده است که فاقد ویتلوژنین است (این نمونه فاقد هیچگونه تیماری بوده است). ردیف ۱ تا ۳ از نمونه پلاسمای ماهیان در معرض قرار گرفته با ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم نونیل فنل استفاده شده و ردیف ۴ و ۵ هم از نمونه پلاسمای کنترل مثبت (۵ میلی گرم بر کیلو گرم استرادیول) استفاده شده است (اگر به شکل توجه شود ردیف ۱ تا ۳ قدرت کمتری از ۴ و ۵ دارند). نونیل فنل دردوزهای بالا خاصیت استروژنیتی بالایی و قابل مقایسه با استرادیول دارد؛ علت تقریباً یکسان بودن باندهای بلات هم همین امر می‌باشد.

پس از تایید صحت آنتی بادی پلی کلونال با روش وسترن بلات، داده‌های حاصل ازروش الایزا که در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شده بودند در فرمول حاصل از نمودار (۱ج) قرار داده شده و غلظت‌های نهایی بدست آمد. نتایج نشان داد که تولید این پروتئین با سطح معنی‌داری $P<0.05$ در تیماریهای کنترل مثبت، ۱۰۰، ۱۰میلی گرم نونیل فنل بر کیلو گرم وزن بدن ماهی افزایش یافته است (نمودار شکل۵) اما در تیمار ۱ میلی گرم نونیل فنل بر کیلو گرم وزن بدن ماهی افزایش تولید پروتین ویتلوژنین به نسبت در معرض قرار گرفتن با این ماده نونیل فنل معنی‌دار نبوده است ($p>0.05$). تولید این پروتئین در پلاسمای خون ماهیان در کنترل مثبت (تیمار با ۱۷ بتا استرادیول) غلظتی برابر۳/۴۷±۰/۴۷، در تیمار نونیل فنل با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غلظتی برابر ۱/۵۴±۰/۲، در تیمار نونیل فنل با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غلظتی برابر ۰/۱۳±۰/۰۲، در تیمار نونیل فنل با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم غلظتی برابر۰/۰۵±۰/۰۳ داشته است (داده‌ها بر اساس میانگین± معیار خطای میانگین داده شده است).

بحث

نونیل فنل به عنوان یکی از مونومرهای حاصل از مواد دترجنت، امولسی فایرها، پلاستیک‌ها در بسیاری از صنایع شیمیایی و پلاستیکی و کارخانجات سموم کشاورزی و ضایعات و پساب‌های خانگی، کشاورزی و صنعتی یافت می‌شود. مطالعات اخیر نشان دهنده این است که این مونومر درمقادیر قابل توجهی در آبهای داخلی (Jafari *et al.* 2009) و آب دریای خزر (Mortazavi *et al.* 2012) علی الخصوص رسوبات کف وجود دارد. با توجه به رفتار تغذیه‌ای تاسماهی ایرانی که غذا را از کف دریافت میکند و همچنین استفاده از زنجیره‌های بالای شبکه غذایی (رژیم گوشت خواری) احتمال تاثیر پذیری این ماهی توسط اینگونه مواد شبه استروژنی متصور بود. لذا در این تحقیق تاثیر حضور این ماده بر تولید و تغییرات مقادیر ویتلوژنین پلاسما تحت بررسی قرار گرفت.

همچنین در این بررسی اطلاعات جدیدی راجع به ویتلوژنین تاسماهی ایرانی به دست آمد. همان طور که از نتایج اطاعات حاصل از الکترفورز ژل دناتوره شده (SDS-PAGE) بر می‌آید؛ باند دایمری در منطقه ۲۱۰ کیلو دالتون (مابین نشانگر ۱۵۰ و ۲۵۰ کیلو دالتونی) مشهود است (شکل۲الف و ۲ج). دراین مطالعه در روش ژل فیلتراسیون اندازه باند برابر ۴۲۰ کیلو دالتون وروی ژل (SDS-PAGE) برابر ۲۱۰ کیلو دالتون بود که این نشان دهنده این است که پروتئین ویتلوژنین به صورت دایمر در شکل طبیعی خود وجود دارد. بر اساس یافته‌های قبلی در ماهی خاویاری سفید *Acipenser transmontano* (Linares-casenare *et al.* 2003) اندازه پروتئین ویتلوژنین با استفاده از تطابق نقطه‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی ۲۱۰ و ۱۹۰ کیلو دالتون تخمین زده

شد. در بسیاری از جانوران از جمله خزندگان هم این پروتئین به شکل دایمرگزارش شده است (Shimizu *et al.* 2002). اندازه پروتئین ویتلوژنین در ماهی خاویاری آمور (*Acipenser schrenckii*) ۴۱۰ کیلو دالتون (به روش ژل فیلتراسیون) و دایمر آن ۲۰۵ کیلو دالتون (به روش SDS-PAGE)گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2011) همچنین در بررسی آنها لیپوویتلین به شکل دو سابیونیت ۹۷ و ۳۶ کیلو دالتونی در تخمک مشاهده شده است.

تحقیق حاضر اولین مطالعه روی قابلیت تاثیر پذیری ماهی خاویاری ایرانی در مواجهه با عوامل شبه استروژنی می‌باشد. در این تحقیق مشخص شد که این موجود در مواجهه با عوامل شبه استروژنی از خود واکنش داده که منجر به تغییراتی فیزیولوژیک در بدن آنها می‌شودکه منجر به تولید این پروتئین درتاسماهی ایرانی نابالغ شده است. همچنین برای اولین بار پروتئین ویتلوژنین تاسماهی ایرانی، یکی از مهمترین پروتئین‌های دخیل در تولید مثل جانور شناسایی و تعیین اندازه شد. در فیل ماهی خاویاری (*Huso huso*) نیز با استفاده از رگرسیون خطی نشانگرهای پروتئینی، اندازه پروتئین ویتلوژنین ۱۷۱/۲۴ کیلو دالتون تعیین گردیده است (Paktinat *et al.* 2012).

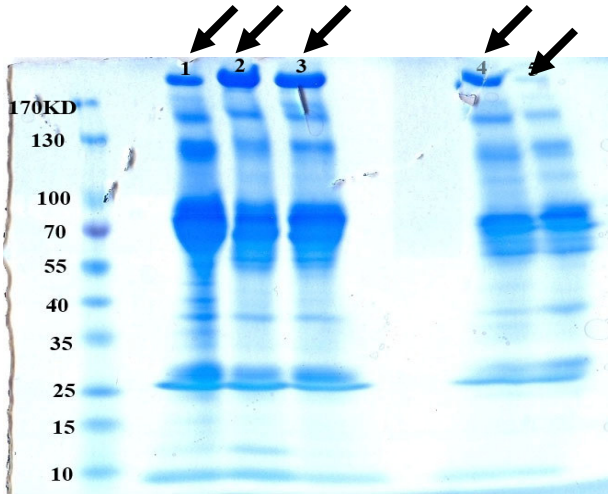
دراین مطالعه چگونگی تاثیر پذیری کمیت پروتئین ویتلوژنین در پلاسمای خون این جانور از طریق اندازه گیری واکنش با پروتئین مخالف آن در سرم خون خرگوش (آنتی بادی پلی کلونال)از طریق واکنش ELISA بررسی گردید. در این مطالعه واکنش الایزا حساسیت تشخیص مواجهه جانور با دوزهای ۱۰۰ و۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی را دارا بوده است ($p<0.05$) اما توان تشخیص در دوزهای پایین یعنی ۱ میلی گرم بر کیلوگرم را نداشت و تاثیرات نونیل فنل بر افزایش ویتلوژنین در تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار نبوده است ($p>0.05$).

میزان تولید پروتئین ویتلوژنین در تیمار۱۰۰ میلی گرم نونیل فنل بر کیلو گرم وزن بدن ماهی در مقایسه با تیمار ۱۰ میلی گرم نونیل فنل بر کیلو گرم به اندازه ۱۰ برابر و بیشتر تولیدپروتئین ویتلوژنین را القا کرده است که این نتایج برای این تیمارها متصور بود اما تیمار ۱ میلی گرم بر کیلوگرم میزان پروتئینی که در ماهی خاویاری القا کرده است؛ معنی‌دار نبوده است.

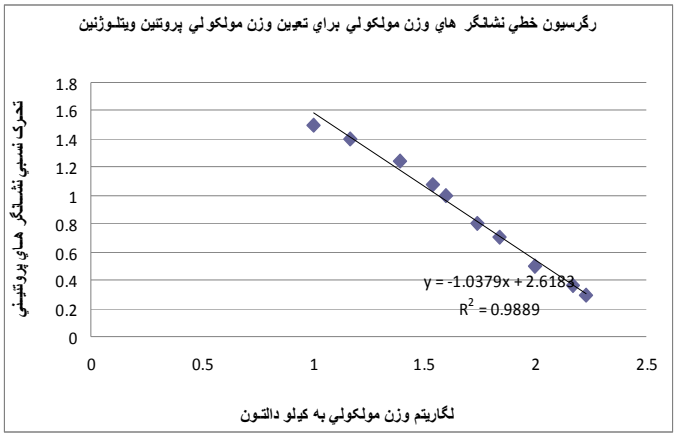
در مطالعه Arukwe *and* Røe (2008) تاثیر دوزهای متفاوت نونیل فنل بر بیان ژن ویتلوژنین و زونا رادیاتا و همچنین تولید پروتئین آنها روی ماهی آزاد (*Salmo salar*) بررسی شده و نشان داده شد که زمان و دوز، تاثیر معنی‌داری بر بیان این ژن‌ها و همچنین تولید پروتئین آنها داشته است. همچنین در مطالعه بر روی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تاثیر نوع دیگری از عوامل استروژنی مثل zeranenol با دوزهای متفاوت و روش ردیابی با بیان ژن و سنجش آنزیمی پروتئین ویتلوژنین (الایزا) نشان داده شد که این ماده منجر به بیان زود هنگام ژن ویتلوژنین و پروتئین آن و ژن زونا رادیاتا و همچنین هورمون ۱۷ بتا استرادیول شده است (Celius, 2000). در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۸ خاصیت استروژنی موادی چون نونیل فنل، بیس فنل، دی بوتیل فتالات (DBP)، بوتیل بنزیل فتالات (BBP)، روی قزل آلای رنگین کمان در مقایسه با کنترل مثبت‌هایی مثل ۱۷ بتا استرادیول، اتینیل استرادیول توسط روش الایزا مورد آزمون قرار گرفت و نتایج بیانگر این بود که نونیل فنل و بیس فنل خاصیت استروژن زایی بالایی در مقایسه با دو ماده ذکر شده دیگر دارند (Arukwe *et al.* 2000). مطالعه‌ای دیگردر سال۲۰۰۰ روی ماهی قزل آلا، تاثیر ماده بیس فنلA را با تاثیر در آب روی سنتز vtg در مدت ۱۲ روز با استفاده از روش ELISA و HPLC با دوزهای تاثیر در آب ۱۰، ۴۰، ۷۰، ۱۰۰، ۵۰۰ µg/l مورد ارزیابی قرار دادند؛ در این مطالعه کاهش بیس فنل در بافت از روز ۶ تا ۱۲ در دوزهای ۷۰ تا ۱۰۰ به علت قابلیت تخریب بیس فنل با آنزیم‌های دفع مسمومیت (detoxification) تشخیص داده شده است. بیشتر ماده سمی از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود. اما در دوز ۵۰۰µg/l قابلیت دفع مسمومیت توسط موجود دیده نشده است (Kwon *et al.* 2001; Lindholst *et al.* 2000).

در سال ۲۰۰۲، در مطالعه‌ای تاثیردوزهای متفاوت اکتیل فنل به صورت خوراکی (Oral) در ماهی فلاندر *Platichthys flesus*، میزان تولید ویتلوژنین را با روش ELISA در خون وروش LC-MASS در بافت‌ها مورد آزمون قرار دادند. آنها دوزهای متفاوت ۱۰، ۵۰، ۱۰۰میلی گرم اکتیل فنل در کیلوگرم وزن بدن را مورد آزمون قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که میزان تولید ویتلوژنین در پلاسمای خون در دوز ۵۰ میلی گرم اکتیل فنل بیشتر موجبات تولید ویتلوژنین در خون را نسبت به دوز ۱۰۰ میلی گرم باعث شده است و به این نتیجه رسیدند که علت آن می‌تواند به خاطر سمیت اکتیل فنل در دوز ۱۰۰ میلی گرم نسبت به ۵۰ میلی گرم باشد که تحریک ترشح کمتری را باعث شده است

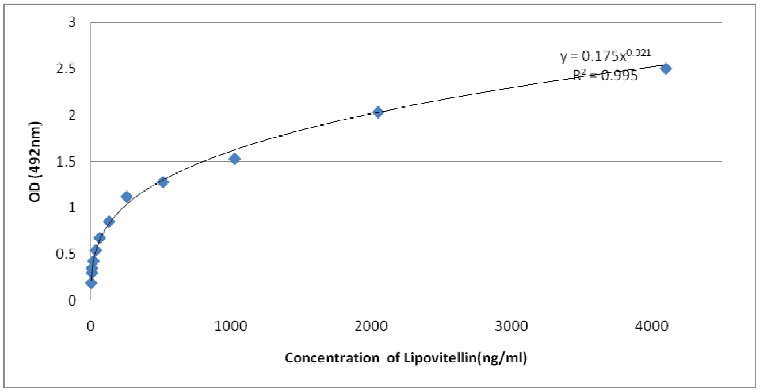
.(Madsen *et al.* 2002)



شکل ۱ الف- فلش‌ها نشان دهنده باند ویتلوژنین تولید شده می‌باشند؛ این باند به وضوح، بالاترین باند در پلاسمارقیق شده خون ماهیان تیمار شده بوده است. ژل SDS-PAGE (سیستم بافری تریس-گلاسین) (مصطفایی؛ ۱۳۷۸) برای ردیابی پروتئین ویتلوژنین در پلاسما ماهیان تیمار شده می‌باشد؛از چپ به راست ردیف۱تا ۳ پلاسمای خون رقیق شده سه نمونه ازماهیان خاویاری ایرانی در معرض ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن ماهی از ۱۷ بتا استرادیول در ۱۰ مایکرولیتر آب دیونیزه رقیق شده است؛ ردیف۴ پلاسمای خون رقیق شده در معرض ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نونیل فنل و ردیف ۵ پلاسمای خون رقیق شده در معرض ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم نونیل فنل بوده است؛نشانگر پروتئینی Fermantas به ترتیب دارای باندهای ۱۷۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۷۰، ۵۵، ۴۰، ۳۵، ۲۵، ۱۵، ۱۰ کیلو دالتون می‌باشند. باند ۷۰ کیلو دالتون نشانگرپروتئینی پررنگتر دیده می‌شود.

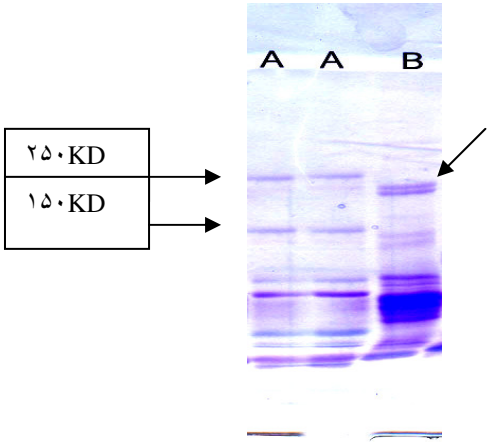


شکل ۱ ب- نمودار رگرسیون خطی نشانگرهای وزن مولکولی برای تعیین وزن مولکولی پروتئین ویتلوژنین؛محور x نشان دهنده لگاریتم وزن مولکولی نشانگرهای بکار رفته به کیلو دالتون ومحورy تحرک نسبی هر کدام از آنها می‌باشد؛ نشانگرهای پروتئینی با وزن کمتر تحرک نسبی بالاتری را نشان می‌دهند.

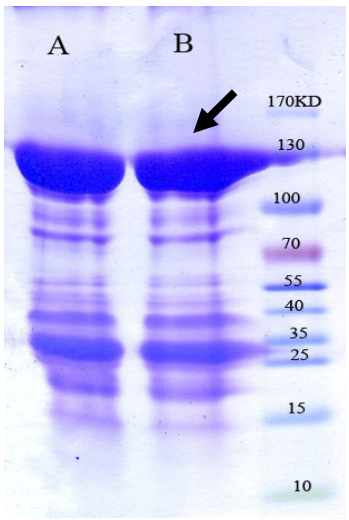


شکل ۱ ج- نمودار حاصل از رقیق سازی پروتئین لیپوویتلین از غلظت ۲ نانوگرم بر میلی لیتر تا ۴۰۹۶ نانوگرم بر میلی لیتر؛ داده‌های حاصل از جذب هر کدام

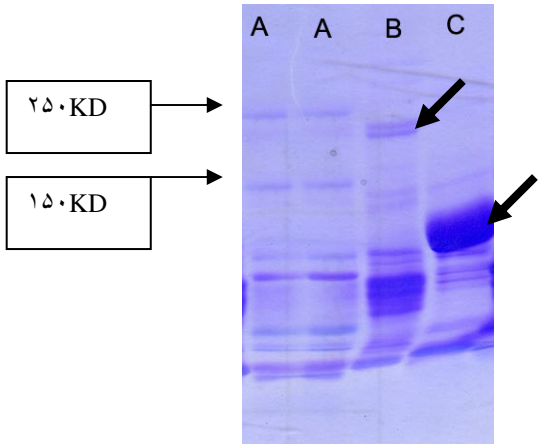
از نمونه‌های تیمار شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر، با استفاده از رابطه رگرسیون نمودار پردازش و عدد حاصل به عنوان غلظت نهایی محسوب شده است.



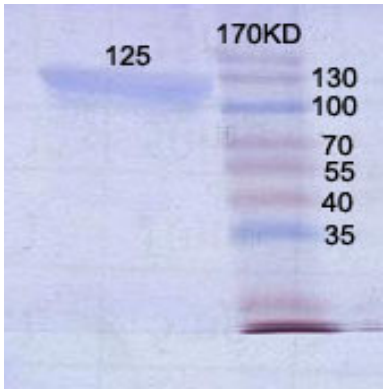
شکل ۲ الف- ژل SDS-PAGE گرادیانت (سیستم بافری تریس گلاسین-با درصدهای متفاوت) با نشانگر پروتئینی با وزن مولکولی بالا. A: نشانگر پروتئینی B: پلاسمای رقیق شده نمونه‌های تیمار شده با ۱۷ بتا استرادیول با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن ماهی؛ باند ویتلوژنین بین نشانگر مولکولی ۱۵۰ تا ۲۵۰ کیلو دالتون (نشانگر پروتئینی BioRad) قرار دارد.



شکل ۲ ب- پروتئین کلیواژ شده ویتلوژنین (لیپوویتین) حاصل از لیز پروتئین تخمک ماهی خاویاری ایرانی. باند ۱۲۵ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE ۸ درصد با فلش مشخص شده است. A و B هر کدام محصول لیز تخمک در لوله‌های جداگانه است.



شکل ۲ ج- مقایسه اندازه مولکولی سابیونیت‌های پروتئین ویتلوژنین در پلاسمای خون و پروتئین لیپوویتلین تخمک (A) نشانگر پروتئینی (B) دایمر پروتئین ویتلوژنین در ژل SDS-PAGE (C پروتئین لیز شده تخمک ماهی خاویاری (لیپوویتلین) در مقایسه با ویتلوژنین در پلاسمای خون؛ پروتئین لیپوویتلین و ویتلوژنین با فلش نشان داده شده است.



شکل ۲ د- باند ۱۲۵ کیلو دالتونی پروتئین لیپوویتین تخمک تاسماهی ایرانی پس از Gel preparative (تخلیص از روی ژل) به منظور تایید صحت تخلیص، دوباره بروی ژل SDS-PAGE رانده شده است تا تک باند بودن آن محرز شود.

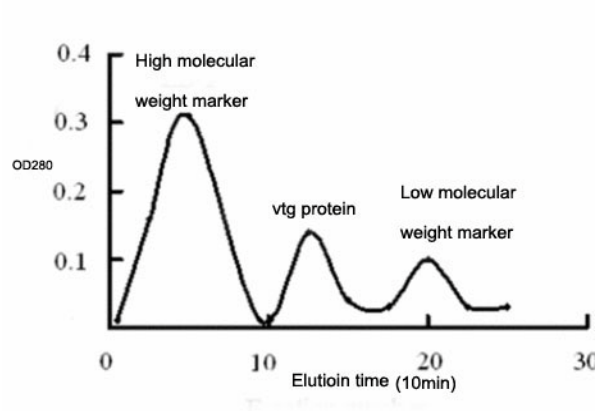
جمع بندی نهایی مبین آن است که پروتئین ویتلوژنین در تاسماهی ایرانی یک پروتئین سنگین وزن با وزن مولکولی ۴۲۰ کیلو دالتون است که برای اولین بار در این مطالعه مورد ارزیابی از لحاظ اندازه مولکولی پروتئین قرار گرفت. این مولکول به شکل دایمر۲۱۰ کیلو دالتونی در روی ژل SDS-PAGE قابل شناسایی بود و زمانیکه از طریق خون به

تخمک انتقال داده می‌شود قسمتی از آن یعنی لیپوویتلین به شکل اندازه کوچکتر ۱۲۵ کیلو دالتونی دیده می‌شود. نتایج میزان تولید این پروتئین در زمان تحریک با مواد استروژنی و شبه استروژنی که از طریق روش الایزا اندازه‌گیری شد مبین آن بود که دوزهای بالای مواد شبه استروژنی و استروژنی موجبات تولید نابهنگام پروتئین ویتلوژنین را در خون تاسماهی ایرانی داشته است و حضور زودهنگام این پروتئین در پلاسمای خون ماهی نابالغ می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی عوامل شبه استروژنی در محیط‌های آبی مطرح باشد.

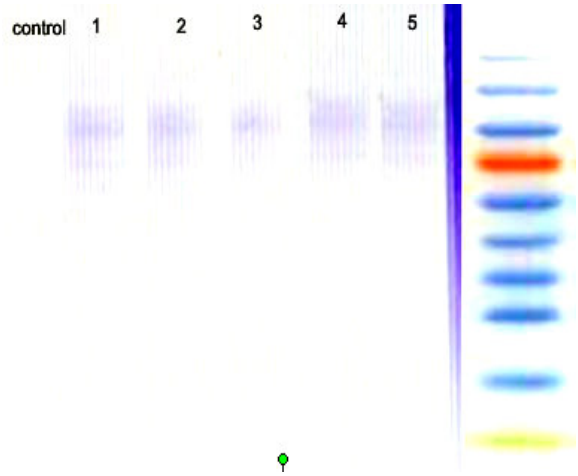
با توجه به نتایج مستند مطالعه حاضر در خاصیت استروژن‌زایی نونیل فنل در تاسماهی ایرانی و تحریک تولید آن در پلاسمای خون، پیشنهاد می‌شود پایش مستمر اینگونه مواد در مناطق مختلف دریای خزر و به ویژه زیستگاه‌های اصلی ماهیان خاویاری این دریا مد نظر مسئولان بازسازی و حفظ ذخائر این گونه ارزشمند قرار گرفته و حساسیت سایر تاسماهیان دیگر دریای خزر نیز مورد ارزیابی قرار داده شود.

سپاسگزاری

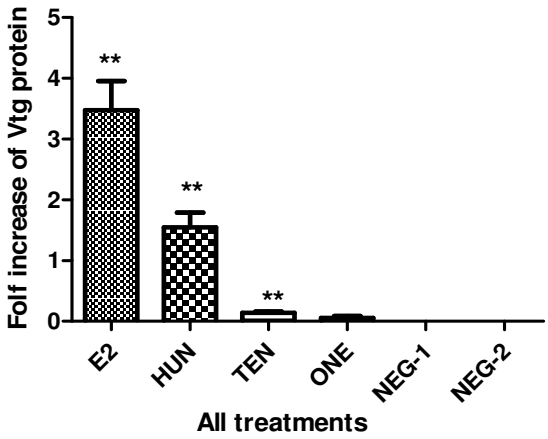
از مدیریت بخش تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دادمان گیلان به جهت همکاری در فراهم سازی امکانات مورد نیاز این پروژه در مدت زمان تیمارها و همچنین آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس جهت همکاری و فراهم سازی امکان انجام آزمایش‌های پروتئینی و جناب آقای دکتر بهرام فلاحتکار هیات علمی محترم دانشگاه گیلان به سبب فراهم‌سازی تخمک تاسماهی ایرانی سپاسگزاری می‌گردد.



شکل ۳-نمودار حاصل از ستون ژل فیلتراسیون برای تعیین وزن مولکولی پروتئین رسوب داده ویتلوژنین. ویتلوژنین حاصل از ژل فیلتراسیون مابین دو وزن مولکولی بالا (۶۷۰ کیلو دالتون) و پایین (۱۵۸ کیلو دالتون) قرار گرفته است. وزن مولکولی ویتلوژنین ۴۲۰ کیلو دالتون با استفاده از رگرسیون خطی نشانگرهای پروتئینی محاسبه شد.



شکل ۴- واکنش وسترن بلاتیگ برای تشخیص پروتئین ویتلوژنین در پلاسمای خون ماهیان در معرض قرار گرفته با نونیل فنل. از آنجا که پروتئین کلیواژ شده لیپوویتلین تخمک برای تولید آنتی بادی پلی کلونال استفاده شده بود؛ قطعه قابل تشخیص روی کاغذ نیترو سلولز همان باند ۱۲۵کیلو دالتون می‌باشد و کنترل منفی پلاسمای فاقد ویتلوژنین حاصل از نمونه‌های تیمار نشده با ۱۷ بتا استرادیول و نونیل فنل (پلاسمای خون ماهی نر) می‌باشد. ستون ۱ تا ۳ از نمونه پلاسمای ماهیان در معرض قرار گرفته با ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم نونیل فنل استفاده شده و ستون ۴ و ۵ هم از نمونه پلاسمای کنترل مثبت (۵ میلی گرم بر کیلو گرم استرادیول) استفاده شده است. (ستون‌های ۱ تا ۳ قدرت کمتری از ۴ و ۵ دارند).



شکل ۵-نمودار مقایسه میانگین میزان تولید پروتئین ویتلوژنین در تیمارهای متفاوت نونیل فنل . E2: ۱۷ بتا استرادیول، HUN: دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم، TEN: دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ONE: دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم-

** نشان دهنده معنی‌دار بودن افزایش پـروتئین ویتلـوژنین ($p< 0.05$) نسبت به کنترل منفی می‌باشد.

منابع

Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994a. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Research 28, 1131–1142.

Ahel M., Giger, W., Schaffner, C., 1994b. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. II. Occurrence and biotransformation in rivers. Water Research 28, 1143–1152.

Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksoyr, A., 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiate protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquatic Toxicology 49, 159-170.

Arukwe, A., Røe, K., 2008. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol. Cell and Tissue Research 331, 701–712.

Celius, T., Matthews, J.B., Giesey, J.P., Zacharewski, T.R., 2000. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiate and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after *in vivo* treatment with estradiol-17ß or α-zeralenol. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 75, 109-119.

Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 1998. Estrogenicity of Xenobiotics in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss)* using *in vivo* Synthesis of Vitellogenin as a Biomarker. Marine Environmental Research 46, 137-140.

Damstra, T., Page, S.W., Herrman, J.L., 2002. Meredith T: Persistent organic pollutants: potential health effects. Journal of Epidemiology and Common Health 56, 824-825.

Gray, M.A., Metcalfe, C.D., 1997. Induction of testis–ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 1082–1086.

Harries, J.E., Shehan, D.D., Jobling, S., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom Rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environ. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 534–542.

Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Hirano, K., 2002: Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso Huso・Acipenser ruthenus*): identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology 131, 429–441.

Hiramatsu, N., Hara, A., 1996. A relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). Comparative Biochemistry and Physiology 115A, 243–251.

Jafari, A.J., Pourkabireh Abasabad, R., Salehzadeh, A., 2009. Endocrine disrupting contaminants in water resoures and sewage in Hamadan city of Iran. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering 6, 89-96.

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

Kawana R., Strussmann CA., Hashimoto S. 2003. Effect of *p*-nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Fish Physiology and Biochemistry 28:213–214.

Kwon, J.Y., Parat, F., Randal, C., Tyler, C.R., 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction 65, 1701-1709.

Linares-Casenare, J. ,Kroll, K. J. ,Van Eenennam,J. P. , Doroshov,S. I. 2003. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured with sturgeon, Aquqculture, 221:643-646.

Lindholst, C., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 48, 87–94.

Madsen, L.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2002. 4-tert-octylphenol and 17b-estradiol applied by feeding to flounder *Platichthys flesus*: induction of vitellogenin and accumulation in tissues, Marine Environmental Research 54, 729-733.

Mortazavi, S., Riyahi Bakhtiari, A., Esmaili Sari, A., Bahramifar, N., Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A. Marine Pollution Bulletin 64, 1067–1073.

Mostafaie, A., 2000. Theoretical and practical guide on gel electrophoresis. Yadavaran Pubication. 134 p.

Neubert, D., 1997. Vulnerability of endocrine system toxenobiotic influence. Regulatory Toxicology and Pharmacology 26, 9-29.

Paktinat, M., Khodabandeh, M., Mojazi Amiri, B., Farahmand, H., 2012. A Simple Method for Purification of low Levels of Beluga (*Huso huso*) Vitellogenin. In: Nejadkoorki, F. (Ed.). Proceedings of International Conference on Applied Life Sciences, Turkey, pp. 65-71.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Oritz Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms :approaches and perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology 143c, 303-15.

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

Schneider, W.J., 1996. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. International Review Cytology 166, 103-137.

Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. Water Quality Research Journal Canada 34, 123-177.

Shimizu, M., Fujiwara, Y., Fukada, H., 2002: Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen. Journal of Experimental Zoology 293, 726–735.

Silverstand C., Haux, C.,1995. Fatty acid composition of vitellogenin from four Teleost species. Journal of Comparative Physiology 164, 593-599.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicocity and treatment in wastewaters. Environmental International 34, 1033-1049.

Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 65, 143-150.

Specker, J.L., Sullivan, C.V., 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: Davey, K.G., Peter, R. E., Tobe, S.S. (Eds.), Perspective in Comparative Endocrinology. National Research Council, Ottawa, Ontario, pp. 304–315.

Sumpter, J.P., 1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. Toxicology Letter 102-103, 337-342.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleost, Review Fish Biology and Fisheries 6, 287-318.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jégou, B., Jensen, TK., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Möller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebæk, N.E.,1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environmental Health Perspectives 104, 741-803.

Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmamalian vertebrate. In: Browder, L.W. (Ed.), Developmental Biology 1. Plenum Press, New York, pp. 127–177.

Wiegand, M.D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. Review in Fish Biology and Fisheries 6, 259-286.

Zhang, Y., Qu, Q., Sun, D., Liu, X., Suo, L., Zhang, Y., 2011. Vitellogenin in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): induction, purification and changes during the reproductive. Journal of Applied Ichthyology 27, 660-665.

Effects of nonylphenol xenoestrogen on production and changes of plasma vitellogenin protein in Persian sturgeon as a Biomarker

S. Jamshidi[1], M. R. Kalbassi[1*], M. Sadeghizadeh[2] and M. A. Yazdani Sadati[3]

[1] Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran
[2] Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Iran
[3] International Center of Sturgeon Research of Guilan, Iran

(Received: 24-Jun.-2012 – Accepted: 8-Oct.-2012)

Abstract

The present study demonstrated the effects of nonylphenol (xenoestrogen) on Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) vitellogenin (VTG) protein changes and production. Identification, purification and changes of vitellogenin protein in sera of fish treated by 17-beta estradiol and different concentration of nonylphenol, were performed. Gel filtration of this protein demonstrated the actual size of vitelogenin is 420KD in the native form, but vitellogenin in denaturated polyacrylamide gel had the form of dimmer protein. Purified cleavage vitelloginin (lipovitelin), which obtained from protein of Persian sturgeon oocyte, injected to rabbit for polyclonal antibody production and polyclonal antibody tested with treated sera for vitellogenin production as a biomarker of xenoestrogen using Wester blotting and ELISA method. All groups treated with 10 and 100mg/kg concentration of nonylphenol had significant effect on VTG protein production ($p< 0.05$) but the group received the lowest dose of nonylphenol (1mg/kg) showed no significant change in VTG protein production. These results further support the negative effect of xenoestrogen on Persian sturgeon, indicating that this index can be used as a biomarker of xenoestrogen in aquatic ecosystems.

Keywords: Vitellogenin, Nonylphenol, Persian sturgeon, 17 beta estradiol.

*Corresponding author: Tel: +98 1226253101 Fax: +981226253499 Email: kalbassi_m@modares.ac.ir