View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

اثر بنزوآلفاپایرن بر سطوح پلاسمایی هورمون‌های موثر در فرآیند اسپرماتوژنز (کورتیزول و تستوسترون) در نرهای رسیده شانک زرد باله *Acanthopagrus latus*

سارا رستگار[۱]، عبدالعلی موحدی نیا[۱و۲*] و زهرا یاراحمدی[۱]

۱. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا
۲. پژوهشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۴

چکیده

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تاثیر بنزوآلفاپایرن (BaP) به عنوان یکی از مهمترین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) بر سطوح کورتیزول پلاسما و فرآیند اسپرماتوژنز از طریق ارزیابی سطوح پلاسمایی هورمون تستوسترون در نرهای رسیده شانک زرد باله *Acanthopagrus latus* صورت گرفت. بدین منظور و برای بررسی اثرات کوتاه مدت و بلند مدت بنزوآلفاپایرن، ماهیان به سه گروه شاهد، پایه و تیمار تقسیم شدند. به گروه تیمار بنزوآلفاپایرن محلول در روغن گیاهی (۵۰mg/kg بنزوآلفاپایرن به ازای وزن بدن ماهی در ۲µl/g روغن به ازای وزن بدن) به صورت درون صفاقی تزریق شد و به گروه شاهد ۲µl/g روغن گیاهی به ازای وزن بدن تزریق گردید. در گروه پایه هیچ گونه تزریقی صورت نگرفت. از هر گروه پس از ۳ ساعت نمونه خون و گناد تهیه شد. برای بررسی اثرات دراز مدت، و رهایش آرام آلاینده، ایمپلنت ۵۰mg/kg بنزوآلفاپایرن به ازای وزن بدن در ۱۰µl/g روغن گیاهی به ازای وزن بدن به صورت درون صفاقی انجام شد. برای ماهیان شاهد ۱۰µl/g روغن گیاهی به ازای وزن ایمپلنت گردید. پس از ۷۲ ساعت از هر گروه نمونه‌گیری صورت گرفت. نتایج به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌دار سطوح پلاسمایی کورتیزول و تستوسترون را در استرس کوتاه مدت و بلند مدت نشان داد. به نظر می‌رسد افزایش کورتیزول به علت ایجاد اختلال توسط بنزوآلفاپایرن در مسیرهای بیوسنتز و آشفتگی در محور هیپوفیز-هیپو تالاموس-اینتررنال باشد. کاهش سطح تستوسترون می‌تواند ناشی از فعال شدن رسپتورهای آریل هیدروکربن در گنادها و تاثیر بر مسیرهای بیوسنتز تستوسترون و یا اختلال در عملکرد محور HPG باشد. آشفتگی در سطوح هورمون‌های تستوسترون و کورتیزول به ویژه در نرهای رسیده سبب ایجاد اختلال در تولیدمثل موفق و بقای نسل ماهی شانک زرد باله می‌شود.

واژگان کلیدی: تستوسترون، کورتیزول، فیزیولوژی تولیدمثل، استرس، هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: amovahedinia@yahoo.com

۱. مقدمه

امروزه آلاینده‌های آلی از جمله هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHها) از طریق فعالیت-های انسانی و از منابعی مثل لکه‌های نفتی حاصل از حمل و نقل و استخراج نفت، فعالیت‌های صنعتی، پساب‌های خانگی و شهری به اکوسیستم‌های دریایی راه می‌یابند (Jonsson *et al.*, 2004). این ترکیبات دارای خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی بالایی هستند (Hendricks et al. 1985). PAH ها به دلیل چربی دوست بودن به راحتی از غشا پلاسمایی عبور کرده و در بافت‌ها به خصوص بافت-های غنی از لیپید از جمله گنادها ذخیره و به تدریج متابولیزه می‌شوند (Billiard *et al.*, 2002) .

ترکیبات PAH زنوبیوتیک بوده و می‌توانند بر تولیدمثل ماهیان اثرات مخربی داشته باشند (Nicolas 1999). این اثرات احتمالا ناشی از اختلال در هورمون‌های جنسی و یا اختلال در محور هیپوتالاموس- هیپو فیز- گناد (HPG) می‌باشد (Pait 2001).

بنزوآلفاپایرن (BaP) هیدروکربنی با وزن مولکولی بالا و سرطان‌زایی زیاد است که توانایی فوق العاده بالایی در ایجاد اختلالات هورمونی دارد (Patel *et al.*, 2006). BaP در ماهیان با فعال کردن رسپتورهای آریل هیدروکربن (AhR) در بافت‌هایی نظیر اینترنال و گنادها شده بیان ژن‌هایCYP1 از خانواده سیتوکروم P450 مونواکسیژناز را تحریک می-کند (Willett et al., 1995). به دنبال فعالیت مونواکسیژنازها، متابولیت‌های دیول اپوکساید حاصل از تجزیه BaP بر ساختار مولکول DNA اثر گذاشته، موجب تغییر در رونویسی می‌گردد که در گناد ها سبب تغییر در بیان ژن فاکتورهای لازم برای تولید اسپرم‌های بالغ از جمله هورمون آندروژنی تستوسترون می‌شود (Patel *et al.*, 2006). هورمون تستوسترون نقش مهمی را در تنظیم مراحل اسپرماتوژنز شامل تولید، تکثیر و بلوغ اسپرم‌ها دارد (Schulz *et* Huhtaniemi and Themmen, 2005 ; *al.*, 2010 Borg and Nagahama, 1994;).

ماهی شانک زرد باله در آب‌های ساحلی اقیانوس هند و آرام زندگی می‌کند و از اهمیت تجاری و اقتصادی بالایی برخوردار است (Allen, 1997). این گونه مانند سایر گونه‌های Sparidae، نر- ماده پروتاندروس و دارای اووتستیس[1] است؛ قسمت میانی-پشتی[2] گناد را تخمدان و قسمت جانبی-شکمی[3] را بیضه تشکیل می دهد که این دو قسمت به کمک دیواره‌ای از بافت پیوندی از هم جدا می‌شو ند (Besseau and Brusl´e-Sicard, 1995). در طی دوره تولیدمثلی در اولین سال بلوغ، قسمت مربوط به بیضه فعال شده و شروع به تولید و آزادسازی اسپرماتوزوآ می‌کند. طی این دوره بافت تخمدانی کوچک باقیمانده و تخمک‌ها به صورت نابالغ باقی می‌مانند و ماهی تنها دارای عملکرد نر است (Alex Hesp *et al.*, 2004).

در این مطالعه به بررسی اثر BaP بر سطوح پلاسمایی هورمون های مهم موثر بر فرآیند اسپرماتوژنز شامل تستوسترون و کورتیزول در نرهای رسیده (هم مرحله جنسی) طی دو مواجهه کوتاه مدت و بلند مدت پرداخته شده است.

۲. مواد و روش ها

در دی ماه ۱۳۸۹ از منطقه خور موسی واقع در حاشیه شمالی خلیج فارس (ایران) تعداد ۴۵ ماهیان شانک زردباله (میانگین وزنی ۷.۲۸± ۱۵۶ گرم) با استفاده از قلاب صید و سپس در ایستگاه تحقیقات ماهیان بندر امام خمینی (ره) حداقل به مدت ۲ هفته در شرایط نوری و دمای طبیعی در تانک‌های ۳۰۰ لیتری آداپته شدند. ماهیان طی دوره آداپتاسیون غذادهی تا ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش به مقدار ۱٪ وزن بدن غذادهی شدند.

1. ovotestes
2. mediodorsal
3. latero-ventral

در آزمایش اول برای بررسی اثرات بنزوآلفاپایرن در کوتاه مدت، تعداد ۲۴ ماهی شانک زرد باله را تقسیم به سه گروه پایه، شاهد و تیمار به کمک محلول ۲-فنوکسی اتانول۰/۲ درصد بیهوش گردیدند. مقدارmg/kg ۵۰ بنزوآلفاپایرن به ازای وزن بدن حل شده در µl/g۲ روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن به گروه تیمار تزریق درون صفاقی شد. برای گروه شاهد تنها ازµl/ g۲ روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن جهت تزریق استفاده شد، در گروه پایه به منظور بررسی اثر استرس تزریق، هیچ گونه تزریقی صورت نگرفت. از هر گروه سه ساعت پس از تزریق نمونه گیری از خون و گناد انجام شد.

طراحی آزمایش دوم مشابه آزمایش اول بود با این تفاوت که به منظور بررسی اثرات مزمن و رهایش آرام آلاینده به جای تزریق، ایمپلنتBaP انجام شد. در گروه تیمار مقدار mg/kg۵۰ بنزوآلفاپایرن به ازای وزن بدن، محلول در µl/g۱۰ روغن نارگیل به ازای وزن بدن به صورت داخل صفاقی، ایمپلنت گردید. در گروه شاهد µl/g۱۰ روغن نارگیل به ازای وزن بدن ایمپلنت شد. از هر گروه ۷۲ ساعت پس از کاشت ایمپلنت، نمونه گیری صورت گرفت. انتخاب این غلظت ها جهت تزریق و ایمپلنت و همچنین مدت زمان مواجهه با استرسور باتوجه به مطالعات قبلی انجام شده بر روی اثرات PAHها بر آبزیان صورت گرفت (Wilson *et al.*, 1998; Pacheco and Santos, 1998; Gesto *et al.*, 2008).

به منظور نمونه گیری سطح آب تانک‌ها را تا حدود ۲۰ لیتر کاهش داده و محلول ۲ فنوکسی اتانول تا حصول غلظت ۰/۲درصد به منظور بیهوش کردن ماهیان استفاده شد. خونگیری از سیاهرگ ساقه دمی با استفاده از سرنگ هپارینه صورت گرفت و نمونه‌های خون تا پایان مرحله خونگیری روی یخ نگهداری شدند. به منظور جدا کردن پلاسما سانتریفیوژ کردن نمونه ها در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه انجام و پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع تا انجام مراحل بعدی در فریزر ۸۰- نگه داری شد.

جهت تعیین جنسیت و مشخص کردن دقیق مرحله جنسی، گنادها را خارج کرده و در محلول بوئن به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تثبیت و سپس نمونه ها تا انجام مراحل بافت شناسی به الکل ۷۰٪ منتقل شدند(Fishelson *et al.*, 2006).

به منظور تعیین مرحله جنسی، پس از انجام مراحل معمول بافت شناسی (آبگیری، شفاف سازی،نفوذ پارافین و قالب‌گیری) برش هایی با ضخامت ۵ میکرومتر از گناد تهیه و با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند. اسلایدهای بافتی تهیه شده برای تعیین مرحله جنسی تحت میکروسکوپ نوری بررسی شدند(Fishelson *et al.*, 2006).

پس از تعیین مرحله گنادی، مقادیر هورمون‌های تستوسترون و کورتیزول پلاسما در ماهیان رسیده با روش ELISA و به ترتیب با بکارگیری کیت DRG (محصولUSA) و کیت تجاری DIMETRA (ساخت ایتالیا) اندازه‌گیری شد.

برای مقایسه میانگین مقادیر هورمون کورتیزول در سه گروه پایه، شاهد و تیمار از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد، جهت مقایسات چندگانه پس آزمون Student-Newman-Keuls اجرا شد. مقایسه هورمون تستوسترون در دو گروه شاهد و تیمار با آزمون t-test انجام گرفت. ضریب اطمینان در هر دو آزمون ۰/۹۵ ($p<۰/۰۵$) است. در تحلیل داده‌ها و رسم نمودار از نرم افزار Sigma plot ver.11 استفاده گردید.

۳. نتایج

در مقیاس ماکروسکوپی گنادها به رنگ سفید روشن بودند. در مطالعات بافت شناسی قسمت بیضه[1] نسبت به تخمدان[2] غالب بود، و در قسمت بیضه این

1 .Testicular part
2.Ovarian part

ماهیان اسپرماتوگونی‌ها[1]، اسپرماتوسیت‌ها[2] و همچنین اسپرماتید[3]های بالغ دیده می‌شد. نتایج نشان داد که اکثر نرها در اوج فعالیت اسپرم زایی قرار داشتند (شکل ۱).

در طی آزمایش هیچ گونه تلفات و اختلاف رفتار نظر حرکات و شنا بین ماهیان سه گروه پایه، شاهد و تیمار تشخیص داده نشد. پس از تزریق و ایمپلنتBaP افزایش معنی دار سطوح کورتیزول پلاسما در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد و پایه ایجاد شد. سطح کورتیزول پلاسما درگروه شاهد نیز نسبت به گروه پایه افزایش یافته بود (شکل۲).

۳ساعت پس از تزریق 50mg/kg بنزوآلفاپایرن، کاهش معنی داری در گروه تیمار نسبت به شاهد ایجاد شد. در آزمایش دوم یعنی ۷۲ ساعت پس از ایمپلنت داخل صفاقی بنزوآلفاپایرن نیز کاهش معنی-داری در سطح تستوسترون پلاسما مشاهده شد(شکل ۳).

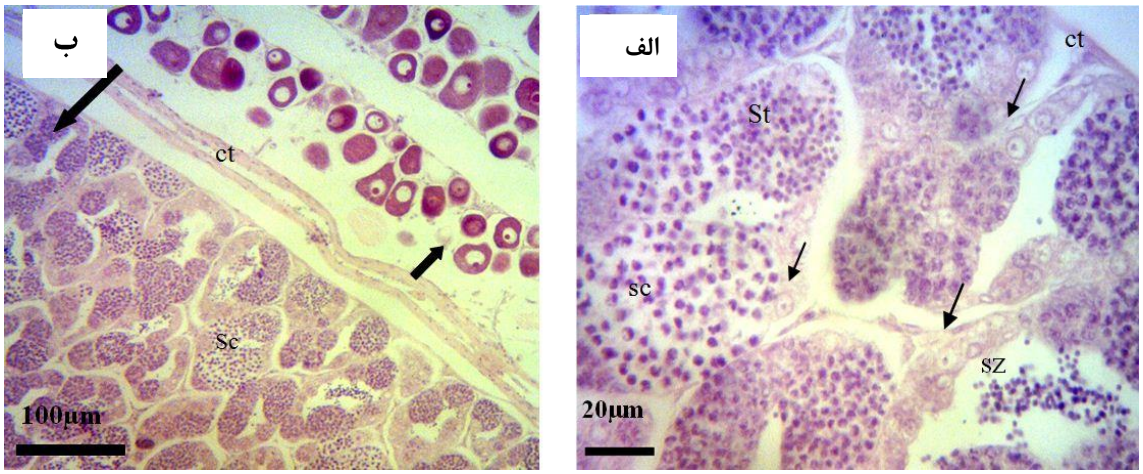
۴. بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که استرس حاد و مزمن BaP می‌تواند سبب افزایش سطوح پلاسمایی کورتیزول شود. افزایش سطح کورتیزول در ماهی کفال راه راه (Thomas *et al.*, 1980)، هرینگ اقیانوس اطلس (Kennedy and Farrell, 2005) و قزل آلای رنگین کمان (Gesto *et al.*, 2009) که در معرض آلاینده‌های هیدروکربنی قرار گرفته بودند، دیده شده است،که همگی نتایج به دست آمده از این مطالعه را تایید می‌کنند. هر چند کاهش سطح کورتیزول در مواجهه با هیدروکربن‌های حلقوی در نتیجه آتروفی سلول‌های کورتیکوتروپ هیپوفیز و ممانعت از ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین نیز گزارش شده است (Hontela *et al.*, 1992). با توجه به نتایج، افزایش سطوح کورتیزل تحت تاثیر توام استرس شیمیایی بنزوآلفاپایرن و استرس فیزیکی حاصل از تزریق و ایمپلنت بوده است (Gesto *et al.*, 2008). ترکیبات PAH با فعال کردن رسپورهای آریل هیدروکربن در هیپوفیز و بافت اینتررنال موجب تغییر در بیوسنتز کورتیزول و تنظیمات فیدبکی مربوط به آن می‌شوند (Hontela, 2005).

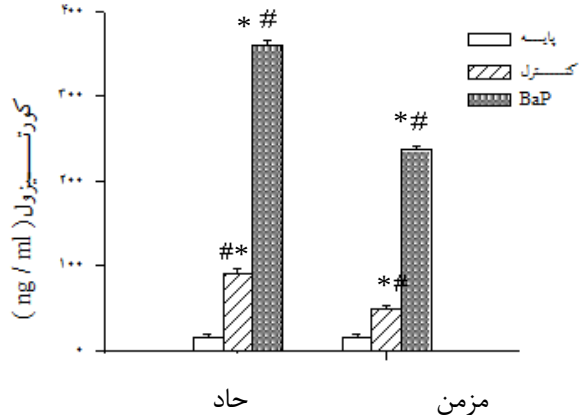
سطح تستوسترون در هر دو آزمایش کوتاه مدت و بلند مدت کاهش معنی داری را نشان داد. مطالعه Schulza و Miura (2002) نشان داد، آلاینده‌های آلی (مثل PAH ها) در کپور معمولی می‌تواند سبب کاهش سطح تستوسترون شود. همچنین مطالعه Lister (2008) روی سطوح تستوسترون در ماهی قرمز(*Carassius auratus*) قرار گرفته در معرض رسوبات حاوی نفت[4] نتایج فوق را تایید می کند. هر چند در مطالعهVan der Kraak و Evanson (2001) PAHها با تحریک GtH II یا تاثیر بر پروستاگلاندین‌ها سبب افزایش سطح تستوسترون در ماهی طلایی و قزل آلای رنگین کمان شدند.

اسپرماتوژنز فرآیند تولید اسپرم‌ها است که توسط هورمون‌های گنادوتروپین ترشح شده از هیپوفیز و به طور کلی محورHPG کنترل می‌شود (Schulz *et al.*, 2010). تستوسترون از مهمترین هورمون‌های آندروژنی است که در تنظیم اسپرماتوژنز نقش دارد. هورمون GtH I و GtH II به ترتیب با اثر بر سلول-های سرتولی[5] و لیدیگ[6] دربیضه‌ها سبب رشد و تغذیه سلول‌های اسپرم و تولید تستوسترون می‌شوند (LeGac *et al.*, 2008). مطالعات نشان می‌دهد که برخی زنوبیوتیک‌ها با اثرآنتاگونیستی بر روی رسپتورهای آندروژنی یا رسپتورهای آریل هیدروکربن سبب اختلال در تولید هورمون‌های استروئیدی جنسی یا آنزیم‌های سنتز کننده آنها می‌شوند (Sanderson, 2006).

1. spermatogonia
2. spermatocytes
3. spermatid
4. oil sands
5. Sertoli
6. Leydig

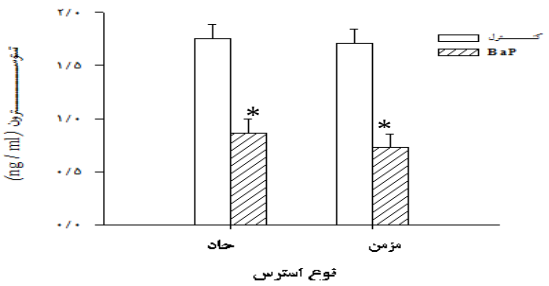


شکل ۱. بافت گناد نر رسیده شانک زرد باله با استفاده از رنگ آمیزی H&E. الف) Sc: اسپرماتوسیت‌ها، St: اسپرماتیدها، sz: اسپرماتوزوآ، Ct : بافت پیوندی و پیکان اسپرماتوگونی. ب) پیکان کوچک: قسمت تخمدانیOvotestes، پیکان بزرگ: قسمت بیضه ای، Sc: اسپرماتوسیت‌ها، Ct: بافت پیوندی.



شکل ۲. تغییرات سطوح کورتیزول پلاسما پس از مواجهه کوتاه مدت (3 hr) و بلند مدت (72 hr) با BaP.

#: اختلاف معنی دار با گروه پایه (P<۰/۰۵) و *: اختلاف معنی دار گروه تیمارBaP با گروه کنترل را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).



شکل ۳. تغییرات سطوح تستوسترون پلاسما پس از مواجهه کوتاه مدت (3 hr) و بلند مدت (72 hr) با BaP.

*: اختلاف معنی دار با گروه کنترل(P<۰/۰۵)

بنزوآلفاپایرن می‌تواند در محیط‌های آبی به عنوان آشفته کننده هورمونی عمل کند. اثر بیولوژیکی BaP از طریق فعال کردن گیرنده‌های آریل هیدروکربن (AhR) اعمال می شود؛ این

رسپتورها از خانواده فاکتورهای رونویسی هلیکس- لوپ- هلیکس است که مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به دفع زنوبیوتیک‌ها را راه اندازی می‌کند (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003). از آنجاییکه باند شدن PAH ها با گیرنده‌های هورمون‌های جنسی، ضعیف است و بیشتر تمایل به باند شدن با AhR ها را دارند، اتصال BaP به AhR سبب بیان ژن های CYP می-شود. این ژن‌ها آنزیم‌های MFO[1]را که در تغییر شکل زیستی PAH ها به منظور سمیت زدایی نقش دارند، کد می‌کنند(Shimada and Guengerich, 2006). اولین مرحله تغییر شکل زیستی BaPتشکیل اپوکسید است، متابولیت‌هایی که از این فرآیند تولید می‌شود 7-8-dihydrodiol 9-10-epoxid(BPDE)- BaP و 6-hydroxy BaP می‌باشد که در چرخه انتقال الکترون تبدیل به رادیکال‌های آزادی می‌شوند که می‌توانند در سلول‌های بیضه با مولکول DNA واکنش داده و در ادامه سطوح رونویسی و ترجمه عوامل موثر در اسپرماتوژنز را مختل کنند (Archibong *et al.*, 2008).

با توجه به حساسیت بسیار بالای سلول‌های لیدیگ بیضه به آلاینده‌های آلی (Mandal *et al.*, 2001) متابولیت‌های بنزوآلفاپایرن می‌توانند اثر مهمی بر کاهش توانایی این سلول‌ها در سنتز و آزاد سازی تستوسترون داشته باشند. بر اساس مطالعات BaPمی تواند سبب آتروفی سلول‌های ترشح کننده تستوسترون و کاهش سطح آن در موش شود (Archibong *et al.*, 2008). Johnson و همکاران (1998) اظهار داشتند هیدروکربن‌های حلقوی می-توانند از طریق بلوکه کردن برخی گیرنده‌های استروئیدهای جنسی در ترشح طبیعی این هورمون‌ها دخالت کنند و موجب کاهش سطح آنها شوند. همچنین کاهش سطح تستوسترون در ماهیانی که تحت استرس شیمیایی PAH ها قرار گرفته اند می-تواند به علت فعال شدن گیرنده‌های Ah در هیپوتالاموس و هیپوفیز و نیز اختلال در محورHPG که در نهایت سلول های ترشح کننده تستوسترون را مهار می‌کند، باشد (Zhou et al., 2000). به علاوه افزایش کورتیزول می‌تواند درکاهش سطوح تستوسترون موثر باشد. برخی مطالعات رابطه معکوس کورتیزول و تستوسترون را تایید می‌کنند (Brownlee et al., 2005).کورتیزول می تواند بر سلول‌های لیدیگ بیضه اثر گذاشته، سبب برهم زدن سیستم آنزیمی سنتز کننده تستوسترون به خصوص اختلال در عملکرد آنزیم ۱۷ آلفا هیدروکسیلاز شوند، که از این طریق موجب کاهش سنتز تستوسترون می‌گردد (Brownlee *et al.*, 2005).

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد؛ BaP در کوتاه مدت و بلند مدت موجب کاهش معنی دار سطوح تستوسترون و افزایش معنی دار کورتیزول پلاسما می‌شود که به دنبال آن می‌تواند در تولید اسپرم‌های بالغ اختلال ایجاد نماید. با توجه به اینکه منطقه خلیج فارس تامین کننده نیمی از نفت جهان است و ۰/۲ تا ۷ در صد نفت را هیدروکربن های حلقوی تشکیل می دهند (Cocchieri *et al.*, 1990)، وجود این آلاینده‌ها می‌تواند برتولیدمثل موفق و بقای نسل ماهیان و همچنین حفظ هومئوستاز و مقابله با شرایط استرس موثر باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب سمینار دانشجویی کارشناسی ارشد مصوب گروه زیست شناسی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام شده است. مولفین بر خود لازم می‌دانند از کمک‌های علمی آقای دکتر احمد سواری (استاد دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر)، آقای دکتر مرتضی بهنام رسولی (استاد دانشگاه فردوسی مشهد)، سرکار خانم دکتر آهنگرپور (استادیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور) و همچنین کمک پرسنل و کارشناسان ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی

[1] Mix function oxygenas

(ره) به ویژه آقایان محمدرضا صحرائیان و مهندس نجف آبادی تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Jonsson, G., Sundt, R. C., Aas, E., Beyer, J. 2004. An evaluation of two fluorescence screening methods for the determination of chrysene metabolites in fish bile. Chemosphere 56: 81-90.

Hendricks, J. D., Meyers, T. R., Shelton, D. W., Casteel, J. L., Bailey, G. S. 1985. Hepato carcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposureand intraperitoneal injection. J. Nat. Cancer Inst. 45: 839–851.

Billiard, S. M., Hahn, M. E., Franks, D. G., Peterson, R. E., Bols, N. C., Hodson, P. V.2002. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). Comp. Biochem. Physiol.: Biochem. Mol. Biol. 133: 55-68.

Nicolas, J. M. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Aquat. Toxicol. 45: 77-90.

Pait, A. S. 2001. Reproductive Endocrine Disruption in the Killifish Fundulus heteroclitus in the Chesapeake Bay University of Maryland College Park.

Patel, R. M., Scheffler, B. E., Wang, L., Willett, L. K. 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killi fish *Fundulus heteroclitus* aromatase activities and mRNA. Aquat. Toxicol. 77: 267–278.

Hontela, A. 2005. Adrenal toxicology: environmental pollutants and the HPIaxis. Elsevier, Amsterdam, p250.

Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J., L., Miguez, J. M. 2009. b-Naphtho flavone and benzo alpha pyrene alter dopaminergic,noradrenergic,and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbowtrout. *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 72: 191–198.

Willett, K., Steinberg, M. A., Thomsen, J., Narasimhan, T. K., Safe, S. H., McDonald, S. J., Beatty, K. B., Kennicutt, M. C. 1995. Exposure of killifishto benzo(a)pyrene: Comparative metabolism, DNA adduct formation and aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonist activities. Comp. Biochem. Physiol. B 112: 93–103.

Borg, B. and . 1994. Androgens in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. C 109: 219-245.

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish . Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.

Schulz, R., deFrança, L., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R., Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 390–411.

Huhtaniemi, I. T. and Themmen, A. P. 2005. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin receptor genes .Endocrine 26: 207-217.

Allen, G. 1997. Marine Fishes of Tropical Australia and South-East Asia.. Perth, Australia: A Field Guide for Divers and Anglers, Western Australian Museum, p 292.

Besseau, L., Brusl´e-Sicard, S. 1995. Plasticity of gonad development in hermaphroditic sparids: Ovotestis ontogeny in a protandric species, *Lithognathus mormyrus*. Environ. Biol. Fish. 43: 255–267.

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

Wilson, J. M., Vijayan, M. M., Kennedy, C. J., Iwama, G. K. 1998. β-Naphtho flavone abolishes interrenal sensitivity to ACTH stimulation in rainbow trout. J. Endocrinol. 157: 63-70.

Pacheco, M., Santos, M. A. 1998. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla*. L. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40: 71–76.

Gesto, M., Soengas, J. L., Miguez, J. M. 2008. Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs(naphthalene, b- naphtho flavone and benzo(a)pyrene). treatment. Aquat. Toxicol. 86:341-351.

Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim. Biophys. Acta 1619: 263-268.

Shimada, T., Guengerich, F. P. 2006. Inhibition of cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. Chem. Res. Toxicol. Sci. 19: 288-294.

Archibong, A. E., Aramandla, R., Niaz, M. S., Brooks, C. M., Roberson, S. R., Lunstra, D. D. 2008.Effects of Benzo(a)pyrene on Intra-testicular Function in F-344 Rats. Environ. Res. Public Health. 5: 32-40.

Mandal, P. K., McDaniel, L. R., Prough, R. A., Clark, B. J. 2001. 7, 12- Dimethl benz(a)anthracene inhibition of steroid production in MA-10 mouse Leydig tumor cells is not directly linked to induction of CYP1B1. Toxicol. Appl. Pharmacol. 175: 200-208.

Johnson, L. L., Sol, S. Y., Ylitalo, G. M., Horn, T., French, B., Olson, O. P., Collier, T. K. 1998. Reproductive anomalies in bottom fish from the Hylebos waterway. Proceedings Puget Sound Research, p 712-722.

Zhou ,T., John-Alder, H. B., Weis, P., Weis, J. S. 2000. Endocrine disruption in mummichogs *Fundulus heteroclitus* from a polluted habitat. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2817–2823.

Brownlee, K. K., Moore, A. W., Hackney, A. C. 2005. Relationship between circulating cortisol and testosterone: influence of physical exercise. J. Sports Sci. Med. 4: 76-83.

Cocchieri, R. A., Arnese, A., Minicucci, A. M. 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Organisms from Italian Central Mediterranean Coasts . Mar. Pollut. Bull. 21:15-24.

Fishelson , L., Delarea, Y., Gon, O. 2006.Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish *Apogonidae Perciformes*. Anat. Embryol. 211: 31-46.

Thomas, P., Woodin, B. R., Neff, J. M. 1980. Biochemical responses of the striped mullet *Mugil cephalus* to oil exposure. I. Acute responses-interrenal activations and secondary stress responses. Mar. Biol 59: 141-149.

Kennedy, C. J., Farrell, A. P. 2005. Ion homeostasis and interrenal stressresponses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasi*, exposed to the watersoluble fraction of crude oil. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323: 43–56.

Hontela, A., Rasmussen, J. B., Audet, C., Chevalier, G. 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs and mercury. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22: 278-283.

Schulz, R. W., Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. Biochem. 26: 43-56.

Lister, A., Nero, V., Farwell, A., Dixon , D. G., Van Der Kraak, G. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish *Carassius auratus* exposed to oil sands process-affected water. Aquat. Toxicol. 87: 170-177.

Evanson, M., Van der Kraak, G. J. 2001. Stimulatory effects of selected PAHs on testosterone production in goldfish and rainbow trout and possible mechanisms of action. Comp. Biochem. Physiol. C130: 249–25.

LeGac, F., Lareyre, J. J., Montfort, J., Esquerré, D., Houlgatte, R. 2008. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. Cybium Suppl. 32: 119-121.

Sanderson, J. T. 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. Toxicol. Sci. 94: 3-21.