



## تأثیر سطوح مختلف غلظت ۱۷- آلفاتینیل‌استرادیول بر شاخصه‌های رشد و میزان بازماندگی میگوی زینتی ردچری (*Neocaridina davidi*) طی تخم‌ریزی‌های متوالی

آسیه محمدیان<sup>۱</sup>، ابوالقاسم اسماعیلی فریدونی<sup>۱\*</sup>، عبدالعلی موحدی‌نیا<sup>۲</sup>، ابراهیم ذبیحی نیشابوری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

<sup>۲</sup> گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر

<sup>۳</sup> گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، بابل

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

۱۷- آلفاتینیل‌استرادیول ( $EE_2$ ) به عنوان یک ترکیب مختل‌کننده غدد درون‌ریز اثرات واضح بر عملکردهای حیاتی موجودات دارد. در این مطالعه، اثرات  $EE_2$  در سطوح غلظتی غیرکشنده صفر (شاهد)، ۰/۲، ۰/۲، ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر آب بر عملکرد رشد و میزان بازماندگی میگوی زینتی ردچری (*Neocaridina davidi*) طی سه مرحله متوالی از تخم‌ریزی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۰/۲، ۰/۲ و ۲ میکروگرم بر لیتر اثرات تحریک‌کننده بر رشد میگو دارند. وزن نهایی و درصد افزایش وزن بدن، طول نهایی و درصد افزایش طول بدن، نرخ رشد ویژه و متوسط نرخ رشد روزانه در این سطوح بالاتر از گروه کنترل و سایر سطوح بود. میزان رشد میگو با افزایش غلظت  $EE_2$  در غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر روند معکوس کاهشی نشان داد. وزن نهایی مولدین ماده در سه تخم‌ریزی متوالی متأثر از غلظت‌های  $EE_2$  قرار گرفت. میزان بازماندگی میگوها روند معنادار کاهشی را با افزایش غلظت  $EE_2$  نشان داد. بر اساس نتایج می‌توان بیان کرد که  $EE_2$  حتی در غلظت‌های کم منجر به اختلال رشد، نوسانات وزنی مولدین و تلفات در میگوی ردچری می‌شوند. وجود این ترکیبات می‌تواند عواقب زیان‌باری در این گونه مدل و احتمالاً سایر آبزبان در اکوسیستم‌های آبی ایجاد نماید.

کلمات کلیدی:

استروژن

تخم‌ریزی

غدد درون‌ریز

میگوی ردچری

هورمون

### مقدمه

انسان و فعالیت‌های انسانی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تخریب محیط زیست از جمله اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شوند، چراکه اکثر آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی در نهایت وارد محیط‌های طبیعی (هوا، آب و خاک) می‌گردند. ترکیبات شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز (Endocrine-disrupting chemicals; EDCs) از آلاینده‌های مهم زیست‌محیطی هستند که با تداخل در سنتز، رهاسازی، متابولیسم و عملکرد هورمون‌های درون‌ریز روی هموستازی (تنظیم و تعادل)، رشد و نمو، رفتار و تولیدمثل موجودات زنده از جمله آبزبان تأثیر می‌گذارند (Carnevali et al., 2018; Huang et al., 2014). اکثر ترکیبات EDCs به دلیل پایداری و چربی‌دوست بودن قابلیت متابولیسم شدن ندارند و نهایتاً در بافت‌های چربی موجودات (از جمله آبزبان) تجمع می‌یابند. همچنین، این ترکیبات قابلیت پیوند با گیرنده‌های هورمونی داشته و می‌توانند آن‌ها را فعال و

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [a.esmaeili@sanru.ac.ir](mailto:a.esmaeili@sanru.ac.ir)

یا سرکوب کنند (Carnevali *et al.*, 2018). مکانیزم چنین روندی از طریق اتصال به گیرنده‌های هسته‌ای، گیرنده‌های هورمون استروئید غیرهسته‌ای، گیرنده‌های غیراستروئیدی و یا با پروسه‌های بدون دخالت گیرنده بر سیستم‌های تولیدمثلی و اندوکروینی می‌باشد (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

استروژن ۱۷-آلفا اتینیل‌استرادیول ( $17-\alpha$ -Ethinylestradiol; EE<sub>2</sub>) یکی از پرمصرف‌ترین استروژن‌ها در جهان بوده که در انسان به عنوان استروژن فعال در قرص‌های ضدبارداری استفاده می‌شود (Lu *et al.*, 2011; Kostich *et al.*, 2013). این استروژن مصنوعی از قدرت پیوند بالایی برخوردار است؛ به طوری که با قدرت ۱۰ برابر نسبت به استرادیول با گیرنده‌های استروژنی باند می‌شود (Thorpe *et al.*, 2003). نیمه‌عمر زیستی اتینیل‌استرادیول و بتا‌استرادیول به ترتیب حدود ۳۳ ساعت و ۱۳ ساعت می‌باشد (Kostich *et al.*, 2013). با مصرف قرص‌های ضدبارداری، بخشی از EE<sub>2</sub> در بدن متابولیزه شده درحالی که مابقی آن از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود. مطالعات قبلی نشان دادند که میزان دفع EE<sub>2</sub> از بدن به شدت به مقدار دارو، مدت زمان مصرف دارو و نوع کاربر وابسته است به طوری که حدوداً ۲۷ درصد از EE<sub>2</sub> مصرفی از ادرار و ۳۰ درصد از طریق مدفوع (به شکل EE<sub>2</sub> آزاد و یا در ترکیب با سولفات و یا گلوکونید) از بدن خارج شده و نهایتاً می‌تواند وارد منابع آبی گردد (Johnson and Williams, 2004; Mao *et al.*, 2004).

اکوسیستم‌های آبی محل نهایی ته‌نشست و دپوی ترکیبات مختلف شیمیایی از طریق تخلیه فاضلاب‌ها و شیرابه زباله‌ها می‌باشند (Scholz and Mayer, 2008). در این میان ترکیبات EDCs در هوا، آب و خاک، بافت‌های بدن انسان، حیات وحش، پرندگان دریایی و آبزیان شناسایی شدند. ولی بیشترین مقادیر آن‌ها معمولاً در سطوح بالاتر زنجیره‌های غذایی در آب‌ها یافت می‌شوند. مطالعات در کشورهای پیشرفته نشان داده است که EE<sub>2</sub> می‌تواند از مسیرهای مختلف از جمله فرآیندهای صنعتی و دفع فضولات انسانی به آب‌های سطحی و زیرزمینی راه یابد (Pye and Patrick, 1983; Petrovic *et al.*, 2004). با توجه به معضلات ایجاد شده توسط این ترکیبات آلاینده در آب‌ها، به نظر می‌رسد که تصفیه فاضلاب به عنوان بهترین روش جهت حذف و یا کاهش مقادیر EE<sub>2</sub> در آب‌ها باشد. ولی محدودیت‌های متعددی در زمینه حذف و یا کاهش مقادیر آن‌ها در تصفیه فاضلاب در مقایسه با سایر استروژن‌های طبیعی وجود دارد. مقاوم بودن EE<sub>2</sub> در برابر تجزیه‌های بیولوژیکی و خاصیت آب-گریزی آن‌ها سبب اتصال این ترکیبات با لجن، منابع کلئید و سایر منابع مواد آلی در آب‌ها می‌شود؛ به طوری که معمولاً ۱۰ تا ۶۶ درصد از این ترکیب همچنان به صورت حذف نشده و حتی پس از سیستم تصفیه در آب‌ها باقی می‌ماند (Jackson and Klerks, 2019). بر این اساس مقادیر مختلفی از EE<sub>2</sub> در بخش‌هایی از محیط‌های آبی شامل رسوبات، آب‌های زیرزمینی، آب‌های سطحی دریاچه‌ای، فاضلاب‌های تصفیه‌خانه‌ها و حتی در آب‌های آشامیدنی گزارش گردید (Campbell *et al.*, 2006). از طرف دیگر این ترکیبات می‌توانند با گذشت زمان در بدن موجودات (از جمله آبزیان) تجمع یافته و تجمع زیستی آن‌ها در بدن در کوتاه و یا درازمدت اثرات نامطلوبی در آن‌ها ایجاد نماید (Lai *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2008). بر این اساس، مقادیر مختلفی از EE<sub>2</sub> در آب‌های سطحی و پساب‌ها و همچنین در ورودی و خروجی‌های فاضلاب‌های شهری در محیط آبی باقی‌مانده که می‌تواند به‌طور بالقوه به عنوان عامل مهمی در اختلالات رشدی و تولیدمثلی حتی در نسل‌های متوالی در آبزیان به شمار رود (Nash *et al.*, 2004; Schäfers *et al.*, 2007).

امروزه نگرانی‌های فراوانی درباره اثرات مخرب این داروها و ترکیبات مشابه شیمیایی بر عملکرد سیستم‌های غدد درون‌ریز در انسان، حیات‌وحش و آبزیان وجود دارد (Van den Bergh *et al.*, 2003). اکثر مطالعات قبلی در زمینه تأثیر ترکیبات مختل-کننده غدد درون‌ریز روی مهره‌داران انجام شده و تحقیقات محدودی در بی‌مهرگان به خصوص بی‌مهرگان آبی‌ری علی‌رغم جایگاه مهم اکولوژیکی آن‌ها در آب‌ها صورت گرفته است (Van den Bergh *et al.*, 2003; Schramm *et al.*, 2008).

میگوی ردچری (Red cherry shrimp) با نام علمی (*Neocaridina davidi*) نوعی سخت‌پوست زینتی آب شیرین بوده که متعلق به زیررده Caridina و خانواده Atyidae است. زیستگاه اصلی جنس *Neocaridina* آب‌های شیرین با جریان کم، چشمه‌ها و مناطق نهری کشورهای جنوب شرق آسیا مانند چین، تایوان، ژاپن، کره و ویتنام می‌باشد. این میگو به دلیل ویژگی‌های متنوع از جمله نگهداری آسان، سازگاری بالا در برابر پارامترهای کیفی آب، تخم و بدن شفاف، چرخه تولیدمثلی

کوتاه، هم‌آوری نسبتاً بالا، قابلیت واکنش سریع و حساسیت به مواد سمی به عنوان یک آبرزی مدل ایده‌آل در مطالعات تولیدمثلی، سم‌شناسی و اکوتوکسیکولوژی محسوب می‌شود (Kenny et al., 2014; Sung et al., 2014). مطالعه حاضر به بررسی تأثیر ۱۷- آلفاتینیل‌استرادیول (استروژن فعال در قرص‌های ضدبارداری) بر شاخصه‌های رشد و میزان بازماندگی میگوی ردچری در سه مرحله متوالی از تخم‌ریزی متمرکز گردید.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و سازگاری میگوی ردچری با شرایط آکواریوم

تعداد ۹۰۰ قطعه بچه میگوی ردچری از مراکز معتبر خصوصی (مرکز تکثیر ماهی زینتی هامون، شهرک مارلیک، تهران) خریداری و به مدت دو هفته در آکواریوم‌های با ظرفیت آگیری ۸۰ لیتر و در درجه حرارت ۲۶-۲۷ درجه سانتی‌گراد، طول دوره نوری ۱۲:۱۲ (روشنایی: تاریکی)، pH آب ۷/۲-۷/۱ و شوری صفر در هزار همراه با هوادهی ملایم نگهداری شدند. غذادهی میگوها یک بار در روز و به میزان ۳ درصد از وزن بدن با جیره غذایی تجاری (با نام تجاری CP: میزان پروتئین و چربی به ترتیب ۳۰ و ۹ درصد) انجام گرفت (Shih and Cai, 2007).

### تشخیص و جداسازی مولدین نر و ماده

میگوهای ماده دارای اندازه بزرگ‌تر و بخش شکمی گسترده‌تری نسبت به نرها هستند. ماده‌ها دارای تخمدان در سطح پشتی شکمی و منحنی کوچکی (Curved underbelly) در زیر دم می‌باشند (Klotz and Rintelen, 2014). وجود زین پشت (saddle) یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها در تشخیص جنسیت میگوی ردچری می‌باشد؛ به طوری که این زین دقیقاً در پشت سر میگوی ماده و دو طرف کمر قرار دارد (Shih and Cai, 2007). بر این اساس، میگوهای نر و ماده جداسازی شده و در آکواریوم‌های مخصوص نگهداری مولدین تا شروع انجام مطالعه قرار گرفتند.

### مواجهه میگوی ماده ردچری با EE<sub>2</sub>

ابتدا ترکیب خالص ۱۷- آلفاتینیل‌استرادیول از شرکت داروسازی ابوریحان (تهران، تهران پارس) تهیه و مقادیر مختلف غلظتی با کمک حلال اتانول در غلظت‌های لازم آماده‌سازی شد. در این مطالعه، ۶ سطح از غلظت EE<sub>2</sub> (هر سطح به عنوان یک تیمار و هر تیمار در سه تکرار) شامل سطوح غلظتی غیرکشنده صفر، ۰/۰۲، ۰/۲، ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم EE<sub>2</sub> در هر لیتر از آب آکواریوم تأمین شد. غلظت‌های مذکور بر اساس مطالعات قبلی در زمینه تعیین غلظت کشندگی ترکیب اتنیل‌استرادیول در سخت‌پوستان انتخاب شدند (Van den Bergh et al., 2003; Wisniewska and Szaniawska, 2015).

در مرحله بعد، تعداد ۳۰ قطعه میگوی ماده (با میانگین وزن اولیه ۴۰/۲±۱/۴ میلی‌گرم و طول اولیه ۱۰/۹±۰/۲۹ میلی‌متر) در آکواریوم‌های با ظرفیت مفید آگیری ۱۰ لیتر و مجموعاً در ۱۸ آکواریوم (هرکدام به عنوان تکرار- مجموعاً ۵۴۰ میگوی ماده) توزیع شدند. جهت مواجهه میگوها با EE<sub>2</sub> از روش مواجهه نیمه-استاتیک استفاده شد؛ به طوری که آب آکواریوم‌ها با توجه به نیمه‌عمر EE<sub>2</sub>، در هر دو روز یک‌بار به طور کامل تخلیه شده و با آگیری مجدد از تانک ذخیره، غلظت موردنظر از EE<sub>2</sub> مجدداً تعیین و به آکواریوم‌ها افزوده شد (Van den Bergh et al., 2003). اثرات مواجهه مزمن میگوها با EE<sub>2</sub> تا سه مرحله متوالی از تکثیر (تخم‌ریزی) و جمعاً به مدت ۱۲۰ روز بررسی شد.

در طول دوره آزمایش، آب موجود در تانک‌های ذخیره همانند آب استفاده شده در آکواریوم‌ها بود و پارامترهای کیفی آب در طول دوره در کلیه آکواریوم‌ها دارای درجه حرارت ۲۶-۲۷ درجه سانتی‌گراد، pH آب ۷/۷-۷/۲، میزان اکسیژن محلول ۶/۱-۵/۸ میلی‌گرم بر لیتر و سختی آب ۹۰-۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم بود. میگوها در طول دوره مواجهه ۲ بار در روز (ساعات ۷ صبح و ۱۹ عصر) و با غذای تجاری به میزان ۳ درصد از وزن بدن غذادهی شدند (Shih and Cai, 2007).

### شاخصه‌های رشد و میزان بازماندگی میگوها

جهت بررسی روند رشد طولی و وزنی میگوها، نمونه‌برداری و بیومتری از میگوهای ماده به منظور اندازه‌گیری طول و وزن میگوها (با استفاده از کولیس دیجیتالی و ترازوی یک‌هزارم) در هر مرحله و قبل از آغاز تکثیر با نمونه‌برداری تصادفی از سه میگو از هر آکواریوم (تکرار) انجام شد. نظر به اهمیت هر دو پارامتر وزن و طول در آبزیان زینتی، شاخصه‌های مربوط به هر دو پارامتر مذکور در میگوها بررسی شدند.

شاخصه‌های رشدی میگوها در تیمارهای مختلف شامل درصد افزایش وزن بدن (Weight gain percentage)، درصد افزایش طول بدن (Length gain percentage)، نرخ رشد ویژه (وزن و طول) (Specific growth rate)، متوسط نرخ رشد روزانه (Average daily growth rate)، فاکتور وضعیت (Condition factor) و میزان بازماندگی (Survival rate) بر اساس روابط زیر تعیین شد (Kumlu et al., 2000):

$$\text{درصد افزایش وزن بدن} = (\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه}) / \text{وزن اولیه} \times 100$$

$$\text{درصد افزایش طول بدن} = (\text{طول نهایی} - \text{طول اولیه}) / \text{طول اولیه} \times 100$$

$$\text{نرخ رشد ویژه وزنی} = (\text{لگاریتم نپیرین وزن نهایی} - \text{لگاریتم نپیرین وزن اولیه}) / \text{طول دوره پرورش} \times 100$$

$$\text{نرخ رشد ویژه طولی} = (\text{لگاریتم نپیرین طول نهایی} - \text{لگاریتم نپیرین طول اولیه}) / \text{طول دوره پرورش} \times 100$$

$$\text{متوسط نرخ رشد روزانه وزنی} = (\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه}) / \text{طول دوره پرورش}$$

$$\text{متوسط نرخ رشد روزانه طولی} = (\text{طول نهایی} - \text{طول اولیه}) / \text{طول دوره پرورش}$$

$$\text{فاکتور وضعیت} = [\text{وزن نهایی} / (\text{طول نهایی})^3] \times 100$$

$$\text{میزان بازماندگی (درصد)} = (\text{تعداد کل میگوی سالم باقی‌مانده} / \text{تعداد کل اولیه میگوی معرفی شده}) \times 100$$

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مطالعه بعد از نرمال‌سازی در قالب طرح کاملاً تصادفی وارد شده و تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام گرفت. به منظور مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معناداری ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) استفاده شد. از نرم‌افزارهای Excel برای ترسیم نمودارها استفاده شد. کلیه مقادیر به صورت میانگین به همراه خطای استاندارد از میانگین ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) ارائه شدند.

### نتایج

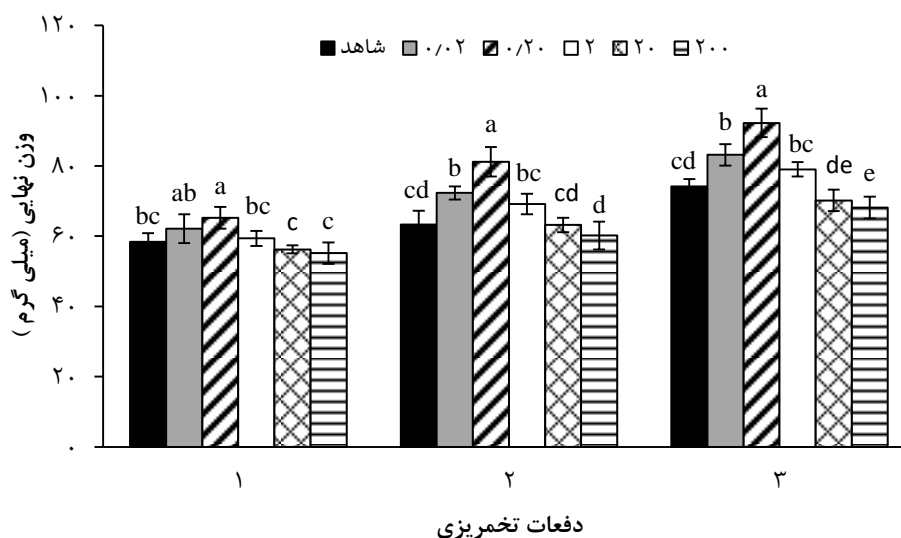
وضعیت شاخصه‌های رشد میگوی ردچری مواجهه شده با سطوح مختلف از غلظت‌های  $\text{EE}_2$  در طی دوره پرورش ۱۲۰ روزه نشان داد که بیشترین وزن نهایی بدن (۹۲/۲۷ میلی‌گرم)، درصد افزایش وزن بدن (۱۲۸/۱ درصد)، طول نهایی بدن (۱۸/۴ میلی‌متر) و درصد افزایش طول بدن (۶۷/۶ درصد) در میگوهای مواجهه شده با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر لیتر و کمترین مقادیر شاخصه‌های مذکور در میگوهای مواجهه شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. مقادیر فاکتور وضعیت اختلاف معناداری بین تیمارها نشان نداد ( $P > 0.05$ )؛ با این حال بیشترین و کمترین مقادیر آن به ترتیب در گروه شاهد (۱/۶۹) و تیمار مواجهه ۰/۲ میکروگرم بر لیتر (۱/۴۸) به ثبت رسید. همچنین، میگوهای گروه شاهد بیشترین میزان بازماندگی (۷۹/۶ درصد) همراه با اختلافات معنادار با سایر تیمارها را نشان دادند ( $P < 0.05$ ) و کمترین بازماندگی (۵۷/۹ درصد) در میگوهای مواجهه شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر بود که با سایر تیمارها به غیر از تیمارهای ۲ و ۲۰ میکروگرم در لیتر اختلاف معنادار نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۱).

روند وزن نهایی میگوهای ماده ردچری در هر یک از دفعات تخم‌ریزی متأثر از غلظت‌های مختلف  $\text{EE}_2$  نشان داد که میانگین وزن نهایی میگوها در تخم‌ریزی اول آن‌ها در غلظت ۰/۲ میکروگرم بر لیتر نسبت به سایر تیمارها به‌طور معناداری افزایش داشت ( $P < 0.05$ ). اختلاف در میانگین وزن نهایی میگوها در تخم‌ریزی‌های دوم و سوم در بین تیمارها به مراتب شدیدتر بود به‌طوری‌که بیشترین میانگین وزن نهایی در غلظت ۰/۲ میکروگرم بر لیتر و کمترین مقدار در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر حاصل شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱).

جدول ۱. شاخصه‌های رشد میگوی ردچری (*Neocaridina davidi*) مواجه شده با سطوح مختلف از غلظت ۱۷- آلفاتینیل استرادیول ( $EE_2$ ) در طول دوره پرورش (۱۲۰ روز)

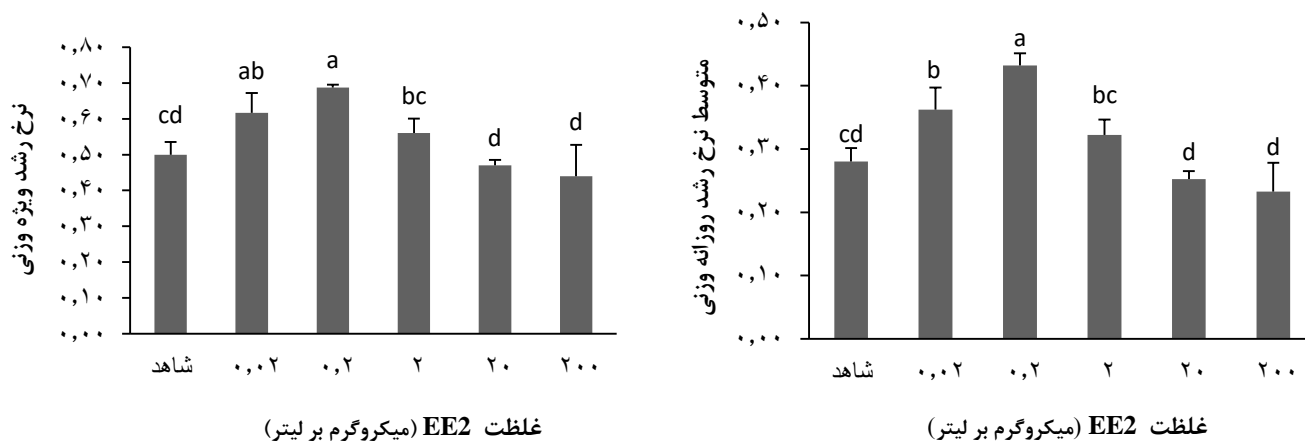
شاخصه	غلظت‌های ۱۷- آلفاتینیل استرادیول (میکروگرم بر هر لیتر آب)				
	شاهد (صفر)	۰/۰۲	۰/۲	۲	۲۰۰
وزن اولیه (میلی‌گرم)	۴۰/۵±۱/۰۵	۳۹/۷±۱/۳۶	۴۰/۴±۱/۷۶	۴۰/۴±۱/۱۵	۴۰/۲±۲/۴۴
وزن نهایی (میلی‌گرم)	۷۴/۱۸±۲/۱۲ <sup>cd</sup>	۸۳/۱۶±۳/۰۶ <sup>b</sup>	۹۲/۲۷±۴/۰۴ <sup>a</sup>	۷۹/۰۳±۲/۰۳ <sup>bc</sup>	۶۸/۱۵±۳/۱۱ <sup>e</sup>
افزایش وزن بدن (درصد)	۸۳/۱±۷/۷ <sup>cd</sup>	۱۰۹/۹±۱۳/۷ <sup>ab</sup>	۱۲۸/۱±۲/۱ <sup>a</sup>	۹۶±۹/۴ <sup>bc</sup>	۷۰±۱۷/۵ <sup>d</sup>
طول اولیه (میلی‌متر)	۱۰/۹±۰/۲۹	۱۰/۸±۰/۱۹	۱۱±۰/۸۳	۱۰/۷±۰/۵۱	۱۰/۸±۰/۵۸
طول نهایی (میلی‌متر)	۱۶/۴±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۷/۱±۰/۴۴ <sup>b</sup>	۱۸/۴±۰/۴۷ <sup>a</sup>	۱۶/۸±۰/۱ <sup>bc</sup>	۱۵/۹±۰/۵۴ <sup>d</sup>
افزایش طول بدن (درصد)	۵۰/۳±۴/۱ <sup>b</sup>	۵۹/۵±۶/۸ <sup>ab</sup>	۶۷/۶±۸/۹ <sup>a</sup>	۵۶/۷±۷/۴ <sup>ab</sup>	۴۷/۱±۳/۴ <sup>b</sup>
فاکتور وضعیت	۱/۶۹±۰/۰۲	۱/۶۵±۰/۰۷	۱/۴۸±۰/۱۸	۱/۶۸±۰/۰۵	۱/۶۹±۰/۰۱
میزان بازماندگی (درصد)	۷۹/۶±۷/۰۵ <sup>a</sup>	۷۰±۲/۹ <sup>b</sup>	۶۹/۷±۲/۶ <sup>b</sup>	۶۳/۴±۳/۰۲ <sup>bc</sup>	۵۷/۹±۱/۱۴ <sup>c</sup>

\* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند ( $P < 0.05$ ).



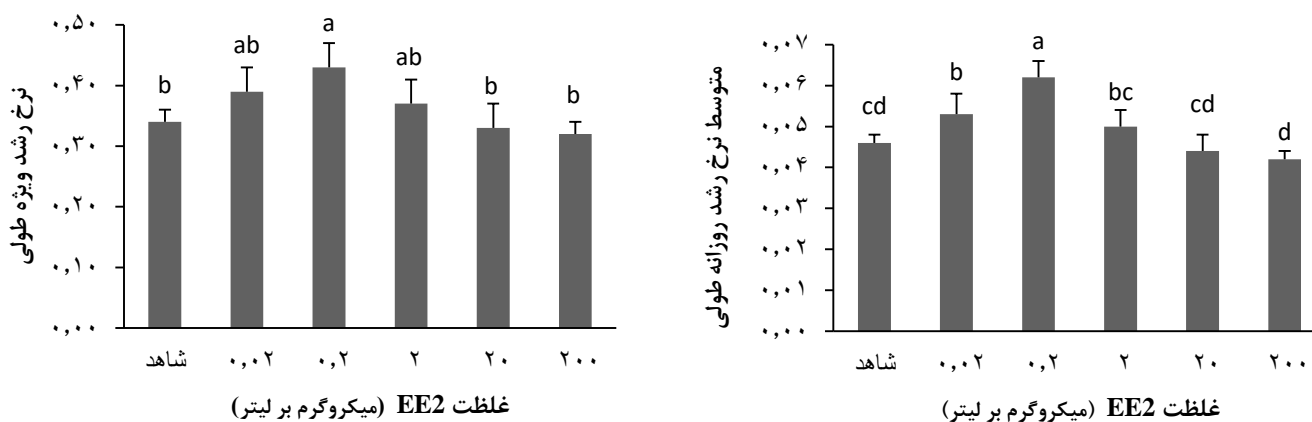
شکل ۱. میانگین وزن نهایی بدن در میگوی ردچری (*Neocaridina davidi*) مواجه شده با سطوح مختلف از ۱۷- آلفاتینیل استرادیول ( $EE_2$ ) در هر یک از دفعات تخم‌ریزی (سه مرحله متوالی تخم‌ریزی) در طول دوره پرورش (۱۲۰ روز)

نرخ رشد ویژه و متوسط نرخ رشد روزانه وزنی اختلاف معناداری در بین تیمارها داشت ( $P < 0.05$ ). بالاترین سرعت رشد ویژه در میگوهای مواجهه شده در غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۲ میکروگرم بر لیتر در مقایسه با سایر گروه‌ها بود ( $P < 0.05$ ) ولی بین غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر اختلافات معناداری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). بیشترین سرعت رشد روزانه در میگوهای مواجهه شده با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر لیتر همراه با اختلاف معنادار با سایر تیمارها به دست آمد ( $P < 0.05$ ) درحالی‌که کمترین مقادیر در سطوح غلظتی ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر به ثبت رسید (شکل ۲).



شکل ۲. نرخ رشد ویژه و متوسط نرخ رشد روزانه وزنی در میگوی ردچری (*Neocardina davidi*) مواجه شده با سطوح مختلف از ۱۷-آلفاتینیل-استرادیول (EE<sub>2</sub>) در طول دوره پرورش (۱۲۰ روز)

مقایسه نرخ رشد ویژه و متوسط نرخ رشد روزانه طولی در میگوهای در معرض قرار گرفته با غلظت‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان این شاخص‌ها در میگوهای مواجه شده با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر لیتر همراه با اختلاف معناداری با سایر تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). کمترین میزان متوسط نرخ رشد روزانه طولی در میگوهای واقع در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر همراه با اختلاف معناداری با میگوهای مواجه شده با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۲ میکروگرم بر لیتر دیده شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).



شکل ۳. نرخ رشد ویژه و میانگین نرخ رشد روزانه طولی در میگوی ردچری (*Neocardina davidi*) مواجه شده با سطوح مختلف از ۱۷-آلفاتینیل-استرادیول (EE<sub>2</sub>) در طول دوره پرورش (۱۲۰ روز)

## بحث

ترکیب ۱۷-آلفاتینیل‌استرادیول (EE<sub>2</sub>) در طیف وسیعی از محصولات دارویی اعم از قرص‌های ضدبارداری، داروهای جایگزین هورمون برای درمان علائم یائسگی یا پس از یائسگی، اوفورکتومی (برداشتن تخمدان)، وازوموتور (vasomotor)، تومورهای بدخیم سینه و پروستات، سندرم ترنر و سایر بیماری‌ها، مکمل‌های غذایی و دامپزشکی استفاده می‌شود (Daughton and Ternes, 1999; Daigle, 2010; Jackson and Klerks, 2019). امروزه نگرانی‌های شدیدی در زمینه جذب و تجمع این ترکیبات به عنوان یک آلاینده دارویی در بدن موجودات زنده اعم از آبزیان وجود دارد. از این نظر بررسی‌های درازمدت تأثیر

این نوع از ترکیبات دارویی بر آبزبان از جمله میگوی زینتی ردچری (به عنوان یک سخت پوست آبری مدل) می تواند بیانگر اثرات احتمالی آن بر بسیاری از شاخصه های حیاتی و فیزیولوژیکی آبزبان باشد.

بررسی نتایج مطالعه حاضر نشان از اثرات واضح  $EE_2$  بر شاخصه های رشد و میزان بازماندگی میگوی ردچری دارد. شاخصه های رشدی میگوی ردچری در پایان سه مرحله متوالی از تکثیر نشان داد که  $EE_2$  بسته به میزان غلظت خود دو روند کاملاً متفاوت را بر پارامترهای رشدی میگو ایجاد می کند. غلظت های کم  $EE_2$  در آب ( $0.2/0$ ،  $0.2/0$  و  $2$  میکروگرم بر لیتر) اثر تحریک کننده بر شاخصه های رشد میگو داشتند؛ به طوری که کلیه شاخصه های رشد شامل وزن و طول نهایی، درصد افزایش طولی و وزنی بدن، نرخ رشد ویژه (طولی و وزنی) و میانگین نرخ رشد روزانه (طولی و وزنی) بیشتر از گروه کنترل و غلظت های  $20$  و  $200$  میکروگرم بر لیتر بود. این در حالی است که روند کاملاً معکوسی روی شاخصه های رشد با افزایش غلظت  $EE_2$  در آب ( $20$  و  $200$  میکروگرم بر لیتر) دیده شد؛ به طوری که رشد میگوها با افزایش میزان  $EE_2$  علی رغم عدم اختلاف معنادار با گروه شاهد کاهش یافت. وضعیت ایجاد اختلالات رشدی و دلایل احتمالی چنین روندی قبلاً در سایر مطالعات و در آبزبان مواجه شده با  $EE_2$  (به عنوان نوعی از آگرواستروژن ها) نیز ارائه گردید. از این نظر یافته های مطالعه حاضر در بسیاری از موارد با نتایج این محققین علی رغم انتخاب سطوح غلظتی متفاوت، نوع و سن گونه آبری و شرایط متفاوت آزمایشی مطابقت دارد (Fenske et al., 2005; Shved et al., 2007; Chen et al., 2017). به عنوان مثال، Melvin (2016) بیان کرد که ماهیان امپراطور قطب (*Hypseleotris compressa*) در مواجهه کوتاه مدت با محلول های  $50$  و  $100$  درصد آب فاضلابی حاوی مقادیر بالای EDCs، روند افزایشی قابل توجهی در وزن بدن نسبت به سایر تیمارها (صفر،  $12/5$  و  $25$  درصد آب فاضلاب) نشان دادند. از طرفی، Lorik و همکاران (2010) عنوان کردند که افزودن  $10$  میلی گرم در کیلوگرم از ترکیب  $11$ - کیتوتستوسترون (*Ketotestosterone*) به جیره غذایی سبب افزایش معنادار در رشد ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) گردید. در مطابقت با نتایج مطالعه حاضر، Chen و همکاران (2017) پیش تر در گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) نتایجی مینی بر بالاتر بودن قابل ملاحظه نرخ رشد ویژه ( $0.9/0$ – $0.82/0$ ) و میزان افزایش وزن بدن ( $5/28$ – $5/18$  گرم) در ماهیان مواجه شده با غلظت های کم  $EE_2$  ( $0.1/0$  و  $1$  نانوگرم بر لیتر) نسبت به گروه کنترل (به ترتیب  $0.57/0$  و  $3/39$  گرم) گزارش کردند.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که کاهش قابل ملاحظه ای در میزان رشد میگوهای واقع در سطوح غلظتی بالای  $EE_2$  ( $20$  و  $200$  میکروگرم بر لیتر) در مقایسه با سطوح غلظتی پایین تر ایجاد گردید. نتایج به وضوح نشان از روند کاهشی در عملکرد رشد میگوی ردچری با افزایش میزان  $EE_2$  در آب دارند که دلایل احتمالی آن به اثر مهارکنندگی  $EE_2$  در غلظت های بالا بر پارامترهای رشد برمی گردد (Daigle, 2010). چنین اثراتی قبلاً در مطالعات Shved و همکاران (2007) در ماهیان نوجوان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با غلظت های بالای  $EE_2$  گزارش شد. در مطالعات آن ها افزودن  $125$  میکروگرم  $EE_2$  در هر گرم غذا به مدت یک ماه سبب اختلالات شدید رشد (طول و وزن) در هر دو جنس نر و ماده گردید؛ به طوری که حتی بعد از  $4$  ماه پس از خاتمه تیمار استروژنی، وزن و طول نهایی بدن همچنان در نرها به ترتیب  $40$  و  $19/5$  درصد و ماده ها به ترتیب  $40$  و  $15$  درصد نسبت به گروه کنترل کاهش داشت که نشان از ماندگاری درازمدت تأثیر این نوع از ترکیبات استروژنی در ماهیان داشت.

ایجاد اختلالات رشدی و دلایل آن از نظر فیزیولوژیکی ممکن است ارتباط واضحی با اختلال در سنتز و میزان ترشح هورمون رشد (Growth hormone; GH) داشته باشد. مطالعه Shved و همکاران (2007) نشان داد که میزان بیان mRNA هورمون رشد در هیپوفیز تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) تیمار شده با  $EE_2$  به شدت کاهش یافت. آن ها نتیجه گرفتند که این کاهش احتمالاً می تواند ناشی از اثرات مستقیم  $EE_2$  بر سلول های ترشح کننده هورمون رشد در هیپوفیز باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که  $EE_2$  موجب مهار رهاسازی GH در سطح هیپوتالامیک گردد، همان طور که هورمون استروژن ( $E_2$ ) بیان سوماتوستاتین (GHIH) (هورمون مهارکننده هورمون رشد) در مغز ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) مواجه شده با  $E_2$  افزایش داد (Canosa et al., 2002). نتایج برخی از مطالعات هم نشان از قابلیت مختل کنندگی استروژن هایی مانند  $E_2$  و  $EE_2$  بر محور هورمون رشد- فاکتور رشد شبه انسولین (GH- IGH-1) در ماهیان دارد (Filby et al., 2007; Shved et al., 2007). به عنوان مثال، یک کاهش  $30$  درصدی فاکتور رشد شبه انسولین در سرم همراه با یک کاهش شدید در میزان mRNA

این فاکتور در کبد تیلایپای تیمار شده با EE<sub>2</sub> گزارش گردید (Shved *et al.*, 2007). فاکتور رشد شبه‌انسولین (Insulin-like growth factor I; IGH) یک هورمون قوی میتوژنیک بوده که موجب تحریک رشد و تمایز در انواع اندام‌های هدف می‌شود. تولید این هورمون عمدتاً در کبد و متأثر از هورمون رشد صورت می‌گیرد (Shved *et al.*, 2007). اگرچه بررسی چنین شاخص‌هایی در مطالعه حاضر انجام نشده است ولی نتایج مرفولوژیکی حاصل از این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای بر انجام مطالعات دقیق‌تر در آینده و به خصوص در مورد سخت‌پوستان آبزی باشد.

از نظر میزان بازماندگی میگوهای ردچری، اثرات EE<sub>2</sub> حتی از سطوح غلظتی پایین به‌واسطه ایجاد تلفات در طول دوره مواجهه در مطالعه حاضر نمایان گردید که می‌تواند نشان از اثرات احتمالی سمیت این ترکیب روی میگوها باشد. بررسی نتایج نشان داد که میزان تلفات میگوها روند افزایشی تدریجی را با افزایش غلظت EE<sub>2</sub> داشتند؛ به‌طوری‌که میگوهای مواجه شده در کلیه سطوح غلظتی EE<sub>2</sub> دارای میزان بازماندگی به‌مراتب کمتری در مقایسه با گروه کنترل بودند. به دلیل عدم وجود مطالعات قبلی در زمینه تأثیر مقادیر EE<sub>2</sub> بر میزان بازماندگی در سخت‌پوستان آبزی، مقایسه نتایج مطالعه حاضر با برخی از یافته‌های قبلی انجام شده روی ماهیان نشان از مطابقت با آن مطالعات دارند. به عنوان مثال، مواجهه ۵۰ روزه با EE<sub>2</sub> در سطوح غلظتی ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میکروگرم بر لیتر منجر به افزایش تلفات به ترتیب ۷، ۱۱، ۱۴، ۵۷ و ۵۸ درصدی در ماهیان نوجوان گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) شد (Sridevi *et al.*, 2015). همچنین، Chen و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که مواجهه مزمن با EE<sub>2</sub> موجب افزایش معنادار در مقدار و فعالیت آلانین‌آمینوترانسفراز و آسپارات‌ترانس‌آمیناز در گربه ماهی زرد (*P. fulvidraco*) گردید. این آنزیم‌ها به عنوان شاخصی برای تشخیص تخریب‌های بافتی (کبد، عضلات و آبشش) بوده و علی‌رغم نقش مهم‌شان در متابولیسم پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه معمولاً در زمان آسیب‌های بافتی به درون پلاسما ترشح می‌شوند (Atli *et al.*, 2015).

دلایل احتمالی در افزایش میزان تلفات در میگوهای ردچری مطالعه حاضر با افزایش غلظت EE<sub>2</sub> در طول دوره مواجهه را بایست با بررسی‌های دقیق‌تر مکانیزم‌های تأثیرگذار بر فعالیت‌های ایمنی، شاخصه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و اندازه‌گیری برخی از آنزیم‌های شاخص در سلامت بافتی بدن میگو مشخص نمود. با این حال نتایج برخی از مطالعات نشان داد که هر یک از عوامل مذکور می‌توانند متأثر از عوامل مختلف از جمله غلظت EE<sub>2</sub>، مدت زمان مواجهه، نوع و سن گونه آبزی و مراحل مختلف رشد آبزی قرار گیرند (Thilagam *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر ردیابی مکانیزم‌های مؤثر بر شاخصه‌های فوق‌الذکر مورد بررسی قرار نگرفته و این موضوعات نیاز به تحقیقات بیشتر در مطالعات آینده به خصوص در مورد گونه‌های مختلف از سخت‌پوستان آبزی دارند.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که سطوح مختلف غلظتی از ۱۷-آلفاتینیل‌استرادیول در آب حتی در غلظت‌های کم می‌توانند منجر به بروز اختلال در عملکرد رشد به خصوص در مولدین (ماده) و ایجاد تلفات در میگوی ردچری گردند. با توجه به نقش کلیدی انتقال انرژی در طول زنجیره‌های غذایی از بی‌مهرگان آبزی به لارو ماهیان در اکوسیستم‌های آبی و با توجه به عوارض شدید ناشی از این آلاینده دارویی در این سخت‌پوست مدل می‌توان عنوان کرد که وجود ۱۷-آلفا اتینیل‌استرادیول در منابع آبی می‌تواند یک زنگ خطر بالقوه برای پایداری جمعیت گونه‌های موجود در یک اکوسیستم آبی محسوب گردد.

## منابع

- Atli, G., Ariyurek, S.Y., Kanak, E.G., Canli, M. 2015. Alterations in the serum biomarkers belonging to different metabolic systems of fish (*Oreochromis niloticus*) after Cd and Pb exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40: 508-515.
- Campbell, C.G., Borglin, S.E., Green, F.B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W. 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. *Chemosphere*. 65: 1265-1280.

- Canosa, L.F., Lin, X., Peter, R.E. 2002. Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinology*. 76: 8-17.
- Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., Basili, D., Maradonna, F. 2018. Endocrine- disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes? *Fish Physiology and Biochemistry*. 44(6): 1561-1576.
- Chen, Y., Li, M., Yuan, L., Xie, Y., Li, B., Xu, W., Meng, F., Wang, R. 2017. Growth, blood health, antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to  $\alpha$ -ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>). *Fish and Shellfish Immunology*. 69: 1-5.
- Daigle, J.K. 2010. Acute responses of freshwater and marine species ethinyl estradiol and fluoxetine. Master Thesis. Agricultural and Mechanical College. Louisiana State University. 137p.
- Daughton, C., Ternes, T. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*. 107(6): 907-938.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. 2009. Endocrine disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 30: 293-342.
- Fenske, M., Maack, G., Schafers, C., Segner, H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 1088-1098.
- Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*. 81: 219-231.
- Huang, Y., Wang, X.L., Zhang, J.W., Wu, K.S. 2014. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproductive function in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction in Domestic Animals*. 50(1): 1-6.
- Johnson, A.C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., Sumpter, J.P. 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*. 348: 167-175.
- Jackson, L.M., Klerks, P.L. 2019. Impact of long-term exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in the live-bearing fish *Heterandria formosa*. *Environmental Contamination and Toxicology*. 77: 51-61.
- Johnson, A.C., Williams, R.J. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental Science and Technology*. 38: 3649-3658.
- Kenny, N.J., Sin, Y.W., Shen, X., Zhe, Q., Wang, W., Chan, T.F., Tobe, S.S., Shimeld, S.M., Chu, K.H., Hui, J.H. 2014. Genomic sequence and experimental tractability of a new decapod shrimp model, *Neocaridina denticulate*. *Marine Drugs*. 12: 1419-1437.
- Klotz, W., Rintelen, T. 2014. To "bee" or not to be on some ornamental shrimp from Guangdong Province, Southern China and Hong Kong SAR, with descriptions of three new species. *Zootaxa*. 3889(2): 151-184.
- Kostich, M., Flick, R., Martinson, J. 2013. Comparing predicted estrogen concentrations with measurements in US waters. *Environmental Pollution*. 178: 271-277.
- Kumlu, M., Eroldogan, O., Aktas, M. 2000. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture*. 188: 167-173.
- Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. 2002. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of the Total Environment*. 289: 159-168.
- Lorik, D., Bradley, F.K., Chhorn, L., Darrent, L., Tetsuya, H., Gordon, G.E. 2010. Effects of 11-ketotestosterone and fishmeal in the feed on growth of juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*. 305: 143-149.
- Lu, G., Yan, Z., Wang, Y., Chen, W. 2011. Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu. *Ecotoxicology*. 20: 974-981.
- Mao, L., Chengjun, S., Hong, Z., Yongxin, L., Desheng, W. 2004. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride. *Analytical Chimica Acta*. 522: 241-246.

- Melvin, S.D. 2016. Short-term exposure to municipal wastewater influences energy, growth, and swimming performance in juvenile Empire Gudgeons (*Hypseleotris compressa*). *Aquatic Toxicology*. 170: 271-278.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*. 112(17): 1725-1733.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez De Alda, M.J., Barcelo, D. 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 378: 549-562.
- Pye, V.I., Patrick, R. 1983. Ground water contamination in the United States. *Science*. 221: 713-718.
- Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. 2007. Concentration and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on reproductive capabilities of the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. 70(9): 768-779.
- Scholz, S., Mayer, I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 293: 57-70.
- Schramm, K.W., Jaser, W., Welzl, G., Pfistera, G., Wohler-Moorhoff, G.F., Hense, B.A. 2008. Impact of 17-  $\alpha$ -ethinylestradiol on the plankton in freshwater microcosms- I: Response of zooplankton and abiotic variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 69: 437-452.
- Shih, H.T., Cai, Y. 2007. Two new species of the land-locked freshwater shrimps genus, *Neocaridina kubo* (Decapoda: Caridea: Atyidae) from Taiwan, with notes on speciation on the island. *Zoological Studies*. 46: 694-680.
- Shved, N., Berishvili, G., D'Cotta, H., Baroiller, J.F., Segner, H., Eppler, E., Reinecke, M. 2007. Ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) differentially interferes with insulin-like growth factor- I (IGF-I) in liver and extrahepatic sites during development of male and female bony fish. *Endocrinology*. 195: 513-523.
- Sridevi, P., Chaitanya, R.K., Prathibha, Y., Balakrishna, S.L., Dutta-Gupta, A., Senthilkumaran, B. 2015. Early exposure of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol and diethylstilbestrol induces morphological changes and alters ovarian steroidogenic pathway enzyme gene expression in catfish, *Clarias gariepinus*. *Environmental Toxicology*. 30(4): 439-451.
- Sung, H.H., Chiu, Y.W., Wang, S.Y., Chen, C.M., Huang, D.J. 2014. Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon shrimp, *Neocaridina denticulate*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 38: 8-13.
- Thilagam, H., Gopalakrishnan, S., Bo, J., Wang, K.J. 2009. Effect of 17- beta-estradiol on the immunocompetence of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28: 1722-1731.
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology*. 37: 1142-1149.
- Van den Bergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T., Janssen, C.R. 2003. Effects of 17-  $\alpha$ -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 216-222.
- Wisniewska, M., Szaniawska, A. 2015. Effect of 17-  $\alpha$ -ethinylestradiol on the time needed for males and females of *Gammarus tigrinus* (Sexton, 1939) to re-couple. *Journal of Environmental Science and Engineering*. 4: 419-425.