

اثرات تکاملی دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات بر فولیکول‌های تخمدانی موش‌های صحرایی نژاد ویستار

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۳/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۶/۱۶

چکیده

مهران درست‌قول*

احمدعلی معاضدی

الهام قلمباز

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر نگرانی‌های در حال افزایشی در خصوص بروز ناهنجاری‌های تولیدمثلی در جمعیت‌های انسانی وجود دارد. این تحقیق با هدف مطالعه اثرات در معرض قرار گرفتن مادر به دی‌اتیل‌هگزیل-فتالات بر روند تکامل پس از تولد تخمدان نوزادان موش‌های صحرایی انجام گرفت. **روش بررسی:** ۴۰ موش صحرایی ماده به‌طور تصادفی به گروه شاهد و سه گروه آزمون، که به‌ترتیب طی دوره شیردهی مقادیر ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات را با روش گاواژ دریافت نمودند، تقسیم شدند. تخمدان نوزادان در سن ۶۰ روزگی پس از تولد از محوطه شکمی خارج و بعد از توزین، تثبیت و آماده‌سازی مقاطع بافتی سریال شش میکرونی، تغییرات ساختاری فولیکول‌های تخمدانی و اجسام زرد مطالعه گردید. **یافته‌ها:** میانگین وزن بدن نوزادان در گروه‌های مورد مطالعه تغییر معنی‌داری نشان نداد. وزن تخمدان نوزادان در گروه دوز بالا به‌طور معنی‌داری ($p=0/037$) کاهش یافت. کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های اولیه ($p=0/012$) و تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه (به‌ترتیب $p=0/023$ و $p=0/012$) و آنترال (به‌ترتیب $p=0/025$ و $p=0/018$) نیز در گروه دوز بالا در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید. همچنین، تعداد اجسام زرد در گروه دوز بالا در ۶۰ روزگی پس از تولد به‌طور معنی‌داری ($p=0/023$) کاهش یافت. علاوه‌براین، افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های آنتریک در گروه‌های دوز متوسط ($p=0/012$) و دوز بالا ($p=0/036$) مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد در معرض قرارگیری مادر در برابر دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات طی دوره شیردهی تکامل پس از تولد ساختار بافتی تخمدان نوزادان را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش باروری و کارایی تولیدمثلی آن‌ها در هنگام بلوغ می‌شود.

کلمات کلیدی: دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات، باروری، فولیکول‌های تخمدانی، تکامل پس از تولد.

* نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز،

دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۱۰۴۵

email: mdoorostghoal@yahoo.com

مقدمه

آندوکراین در محیط باقی مانده و اثرات عمیقی بر حیات وحش و انسان‌ها می‌گذارند.^۱ فتالات‌ها تنها یکی از چندین رده مواد شیمیایی هستند که دارای خواص استروژنی بوده و رفتار استروژنی آن‌ها قبلاً به‌صورت *in vitro* گزارش شده است.^۲ این ترکیبات در بسیاری از محصولات آرایشی، چسب‌ها، محصولات بهداشتی و آرایشی همانند شامپو و صابون و پلاستیک‌های قابل انعطافی مثل اسباب بازی کودکان و ظروف نگهداری مواد غذایی یافت می‌شود.^۳ دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات (Di 2 ethylhexylphthalate (DEHP)، فراوان‌ترین فتالات موجود، که عمدتاً جهت ساخت انواع وسیعی از محصولات پلاستیکی اعم از مواد ساختمانی، پوشاک، مواد بسته‌بندی و وسایل پزشکی مورد

در سال‌های اخیر نگرانی‌های در حال افزایشی در خصوص بروز ناهنجاری‌های تولیدمثلی (Reproductive anomalies) در جمعیت‌های انسانی وجود دارد. بر پایه مطالعات صورت گرفته محققان علت بروز این ناهنجاری‌های تولیدمثلی را به یک‌سری آلوده‌کننده‌های زیست‌محیطی که بر روی سیستم آندوکراین مهره‌داران تأثیرگذار می‌باشند، مرتبط دانسته و از آن‌ها تحت عنوان برهم‌زننده‌های سیستم آندوکراین یاد می‌کنند.^۱ این ترکیبات شیمیایی مشابه استروژن‌ها عمل نموده و یا فعالیت آنتی‌آندروژنی از خود نشان داده و از این طریق فعالیت‌های تولیدمثلی وابسته به هورمون‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. آخرین یافته‌های علمی نشان می‌دهد که برهم‌زننده‌های سیستم

استفاده قرار می‌گیرد به راحتی به طور کامل از ماتریکس جدا شده و وارد محیط می‌شود.^۵ Doull گزارش داد که انسان معمولاً روزانه در معرض $3-30 \mu\text{g}/\text{kg}$ دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات قرار می‌گیرد،^۶ اگرچه در شرایط خاصی همچون همدیالیز روزانه تا $1/5 \text{mg}/\text{kg}$ و طی انفوزیون نوزادان روزانه تا $10-20 \text{mg}/\text{kg}$ افزایش پیدا می‌کند.^۷ از آنجا که دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات قادر به عبور از جفت و همچنین وارد شدن به شیر می‌باشد خطر مهمی برای تکامل جنین و نوزاد تلقی می‌شود.^۸ از سوی دیگر افراد نابالغ به تخریب غدد درون ریز حساس می‌باشند چرا که در این مرحله سیستم تولیدمثلی در حال تکامل بوده و تغییرات کوچک در سطح هورمون‌های درون‌ریز می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی دائمی شود.^۹ در سال‌های اخیر، دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نگرانی عمومی را در خصوص توانایی به خطر انداختن سلامتی، به دلیل اثرات تولیدمثلی آن در مدل‌های حیوانی افزایش داده است.^{۱۰} مشخص گردیده که DEHP دارای قوی‌ترین سمیت تولیدمثلی در بین فتالات‌ها می‌باشد.^{۱۱} این ماده باروری موش‌های صحرایی ماده را کاهش داده و عملکرد تخمدان را تغییر می‌دهد.^{۱۱} دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در بدن سطح استرادیول سرم را کاهش می‌دهد و دوره استروس را در موش‌های صحرایی ماده بالغ طولانی می‌کند.^{۱۲} همچنین، افزایش قابل توجه تعداد فولیکول‌های آرتیک ثالثیه در تخمدان نوزادان به دنبال تجویز دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در موش‌های صحرایی مادر گزارش شده است.^{۱۳} علاوه بر این، مطالعات مختلف صورت گرفته در انسان ارتباط بین فتالات و روند تکامل غیرطبیعی اندام‌های تولیدمثلی در افراد ماده را پیشنهاد می‌کند.^{۱۴} مشخص گردیده که سطوح پلاسمایی DEHP در افراد بالغ مبتلا به ژنیکوماستی به طور معنی‌داری بالاتر از سایر افراد می‌باشد.^{۱۵} قرارگیری کارگران زن در معرض سطح بالایی از فتالات‌ها، با کاهش میزان حاملگی و افزایش نسبت سقط جنین ارتباط دارد.^{۱۴} با توجه به گسترش روزافزون استفاده از فتالات‌ها این تحقیق انجام شد. هدف ما مطالعه اثرات در معرض قرارگیری مادر در برابر DEHP در دوره شیردهی بر روند تکامل پس از تولد فولیکول‌های تخمدانی نوزادان موش‌های صحرایی نژاد ویستار می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و طی بهار ۱۳۸۹ در محل

آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید. ۴۰ موش صحرایی ماده نژاد ویستار ۱۲ هفته با میانگین وزنی $220 \pm 8 \text{g}$ به همراه ۱۰ موش صحرایی نر ۱۴ هفته با میانگین وزنی $240 \pm 10 \text{g}$ از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. موش‌های صحرایی مطابق اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شده و تحت درمان قرار گرفتند. پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط به منظور جفت‌گیری موش‌های نر و ماده در یک قفس نگهداری شدند. پس از پایان دوره بارداری، موش‌های صحرایی مادر به‌طور تصادفی در گروه‌های شاهد و آزمون تقسیم گردیدند. گروه شاهد، از روز دو تا ۲۱ دوره شیردهی، تنها روغن ذرت خالص را به‌صورت گاوآژ دریافت نمودند. برای این منظور روغن ذرت خالص با مقدار $5 \text{ml}/\text{kg}$ وزن بدن مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های صحرایی مادر گروه‌های آزمون با روش گاوآج در تمام طول مدت تیمار در معرض دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات (۱،۲- بنزن دی‌کربوکسیلیک اسید) (مرک آلمان) با دوزهای $500 \text{mg}/\text{kg}$ ، 1000 ، 10000 قرار داده شدند. دوزهای مورد استفاده در این مطالعه با توجه به مطالعات انجام شده در خصوص سمیت تولیدمثلی دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات انتخاب شدند. پس از آن در ۶۰ روزگی پس از تولد در هر گروه از میان نوزادان آن‌ها ۱۰ موش صحرایی به‌طور تصادفی انتخاب و پس از توزین به‌وسیله کلروفرم با دوز بالا کشته شدند. سپس، بلافاصله ناحیه شکمی آن‌ها باز شده و تخمدان‌های آن‌ها از بدن خارج و پس از توزین با استفاده از ترازوی دیجیتال برای مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند. پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافتی مقاطع میکروسکوپی شش میکرومتری به‌صورت سریال از هر یک از تخمدان‌های راست و چپ هر موش صحرایی تهیه و مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین قرار گرفتند. سپس، جهت انجام مطالعه هیستولوژیک و هیستومتریک هر دهمین مقطع بافتی در هر تخمدان به‌صورت مارپیچی از کورتکس به‌طرف مدولای تخمدان در جهت عقربه‌های ساعت مورد بررسی قرار گرفت.^{۱۶} در هر مقطع بافتی تعداد فولیکول‌های آغازی، اولیه، ثانویه، آنترال و آرتیک و نیز اجسام زرد مورد شمارش قرار گرفت. همچنین، قطر بزرگ و کوچک فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد با استفاده از میکرومتر چشمی اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها برآورد گردید. برای این منظور، تنها

مشاهده نشد (نمودار ۲). میانگین تعداد فولیکول‌های آغازی در هیچ‌یک از مراحل زمانی پس از تولد در گروه‌های دریافت‌کننده دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱). میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه دریافت‌کننده ۵۰۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نسبت به گروه شاهد و گروه دریافت‌کننده ۱۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات به صورت معنی‌داری (به ترتیب $p=0/012$ و $p=0/036$) کاهش یافت (جدول ۱). میانگین تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه در گروه دریافت‌کننده ۵۰۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری (به ترتیب $p=0/023$ و $p=0/012$) کاهش نشان داد (جدول ۱ و ۲). همچنین، میانگین تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه در گروه دریافت‌کننده ۵۰۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نسبت به گروه دریافت‌کننده ۱۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات به صورت معنی‌داری (به ترتیب $p=0/047$ و $p=0/035$) کاهش یافت (جدول ۱ و ۲). علاوه بر این، میانگین تعداد و قطر فولیکول‌های آنترال در ۶۰ روزگی پس از تولد در گروه دریافت‌کننده دوز بالای دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری (به ترتیب $p=0/025$ و $p=0/018$) کاهش نشان داد (جدول ۱ و ۲). میانگین تعداد و قطر فولیکول‌های آنترال در ۶۰ روزگی پس از تولد در گروه دریافت‌کننده دوز بالای دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در مقایسه با گروه دریافت‌کننده ۱۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات (به ترتیب $p=0/045$ و $p=0/037$) به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱ و ۲). همچنین، میانگین تعداد اجسام زرد در گروه دریافت‌کننده ۵۰۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری (به ترتیب $p=0/023$) کاهش یافت (نمودار ۳). علاوه بر این، میانگین تعداد فولیکول‌های آنتریک در گروه دریافت‌کننده دوز بالا و متوسط دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در ۶۰ روزگی پس از تولد در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری

فولیکول‌هایی که اووسیت آن‌ها واجد یک هسته مشخص بود مورد شمارش و اندازه‌گیری قرار گرفتند. فولیکول‌های تخمدانی در این مطالعه بر اساس ساختار بافتی به انواع مختلف تقسیم‌بندی شدند. فولیکول‌های دارای یک لایه سلول گرانولوزای سنگفرشی شکل در اطراف سلول اووسیت به عنوان فولیکول آغازی، فولیکول‌های واجد یک لایه سلول‌های فولیکولی مکعبی شکل در اطراف سلول اووسیت به عنوان فولیکول اولیه، فولیکول‌هایی که سلول اووسیت آن‌ها توسط بیش از یک لایه سلول گرانولوزا احاطه شده به عنوان فولیکول ثانویه و فولیکول‌های واجد فضاهای خالی کوچک پراکنده و یا یک حفره آنتروم واحد درون طبقه سلول‌های گرانولوزا به عنوان فولیکول آنتروم در نظر گرفته شدند.^{۱۷} همه فولیکول‌های مورد شمارش به دو دسته سالم و آنتریک طبقه‌بندی شدند. در این مطالعه فولیکول‌هایی که واجد نشانه‌هایی از قبیل پیکنوزه شدن هسته و چین خوردن غشاء سلول اووسیت، جدا شدن سلول‌های گرانولوزا از غشاء پایه، پراکنده شدن و ریزش سلول‌های گرانولوزا به درون حفره آنتروم و ضخیم شدن غشاء پایه سلول‌های گرانولوزا بودند به عنوان فولیکول‌های آنتریک در نظر گرفته شدند.^{۱۸} در نهایت، داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel و نیز نرم‌افزار SPSS ویراست ۹ و بهره‌گیری از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی در سطح معنی‌داری $p<0/05$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

میانگین وزن بدن نوزادان (نمودار ۱) در ۶۰ روزگی پس از تولد بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین وزن تخمدان نوزادان در گروه دریافت‌کننده دوز بالای دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ($p=0/037$) نشان داد اما اختلاف معنی‌داری بین سایر گروه‌ها و گروه شاهد

جدول ۱: میانگین و خطای استاندارد تعداد فولیکول‌های تخمدانی نوزاد موش صحرایی (نژاد ویستار) در ۶۰ روزگی در گروه‌های شاهد و در معرض DEHP مقادیر

۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ mg/kg/day

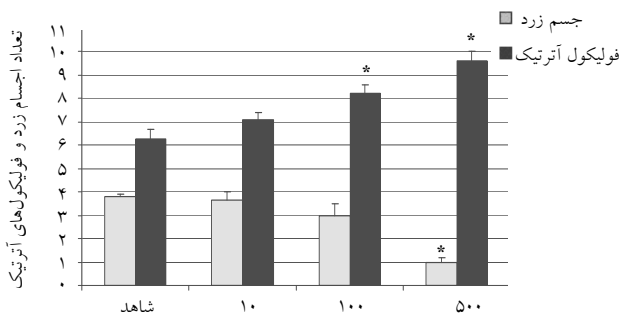
گروه	تعداد فولیکول آغازی	تعداد فولیکول اولیه	تعداد فولیکول ثانویه	تعداد فولیکول آنترال
شاهد (a)	۹/۷۲±۱/۶۴	۷/۱۳±۱/۰۳ ^d	۹/۲۳±۱/۴۴ ^d	۵/۰۰±۰/۶۵ ^d
دوز کم (b)	۹/۶۳±۱/۵۳	۷/۰۶±۱/۰۱ ^d	۹/۱۲±۱/۳۲ ^d	۴/۶۶±۰/۷۷ ^d
دوز متوسط (c)	۹/۴۲±۱/۱۴	۶/۷۸±۱/۰۹	۷/۲۰±۱/۲۶	۳/۱۳±۰/۶۲
دوز زیاد (d)	۱۰/۰۵±۲/۲۰	۵/۵۳±۰/۵۲ ^{ab}	۵/۹۳±۰/۴۸ ^{ab}	۲/۷۳±۰/۴۷ ^{ab}

وجود حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($n=10$ و $p<0/05$) بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد

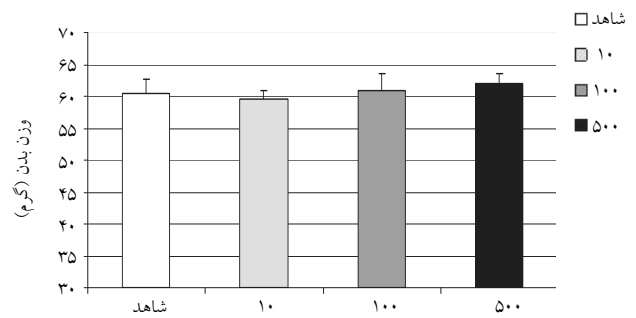
جدول ۲: میانگین و خطای استاندارد قطر فولیکول‌های تخمدانی (μm) نوزاد موش صحرایی (نژاد ویستار) در ۶۰ روزگی در گروه‌های شاهد و در معرض DEHP مقادیر ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ mg/kg/day

گروه	قطر فولیکول آغازی	قطر فولیکول اولیه	قطر فولیکول ثانویه	قطر فولیکول آنترال
شاهد (a)	۲۲/۹۷±۳/۱۵	۵۲/۵۰±۴/۷۰	۱۴۳/۱۲±۴/۶۲ ^d	۲۲۹/۹۰±۸/۲۳ ^d
دوز کم (b)	۲۲/۶۲±۲/۱۶	۵۲/۴۹±۳/۲۹	۱۴۱/۵۱±۳/۶۱ ^d	۲۲۹/۱۴±۷/۴۷ ^d
دوز متوسط (c)	۲۲/۵۱±۳/۰۹	۵۱/۹۳±۲/۷۰	۱۳۹/۲۳±۳/۴۲	۲۲۱/۷۱±۷/۳۱
دوز زیاد (d)	۲۲/۱۹±۲/۱۳	۵۱/۰۱±۳/۰۸	۹۷/۶۲±۲/۵۵ ^{ab}	۱۹۱/۴۲±۵/۲۸ ^{ab}

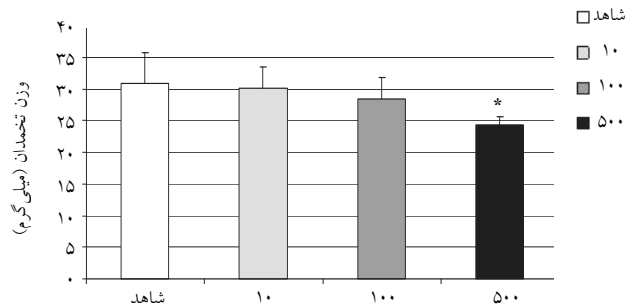
وجود حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($n=10$ و $p<0.05$) بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد.



نمودار ۳: میانگین تعداد اجسام زرد و فولیکول آنتریک تخمدان موش ۶۰ روزه در گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده DEHP مقادیر ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ mg/kg/day ($p<0.05$, $n=10$)*



نمودار ۱: میانگین و خطای استاندارد وزن بدن نوزاد موش (نژاد ویستار) در ۶۰ روزگی، گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده DEHP مقادیر ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ mg/kg/day



نمودار ۲: میانگین و خطای استاندارد وزن تخمدان نوزاد موش (نژاد ویستار) در ۶۰ روزگی، گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده DEHP مقادیر ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ mg/kg/day ($p=0.037$, $n=10$)*

بشری محسوب‌شده و از عوامل مهم ایجاد نگرانی در زوج‌هایی است که زندگی مشترک را آغاز نموده‌اند. در معرض قرارگیری افراد در برابر عوامل خارجی قبل و بعد از شروع بارداری و نیز طی مراحل اولیه پس از تولد می‌تواند توانایی تولیدمثلی و سلامت نوزادان آن‌ها را به خطر بیندازد.^{۱۹} بر پایه مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته محققان علت بروز این تغییرات تولیدمثلی را به یک‌سری آلوده‌کننده-های زیست‌محیطی که بر روی سیستم آندوکراین مهره‌داران تأثیرگذار می‌باشند، مرتبط دانسته و از آن‌ها تحت عنوان برهم‌زننده‌های سیستم آندوکراین یاد می‌کنند.^{۲۰} مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در معرض قرارگیری مادر در برابر دی‌اتیل‌هگزایل‌فتالات طی دوره شیردهی روند تکامل پس از تولد فولیکول‌های تخمدانی در نوزادان آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. Ma گزارش نمود که تجویز پیش از بلوغ دی‌اتیل‌هگزایل‌فتالات در موش‌های صحرایی ماده آغاز بلوغ و فعالیت تولیدمثلی پس از بلوغ را تحت تأثیر قرار می‌دهد.^۵ مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تعداد فولیکول‌های تخمدانی در تخمدان نوزادان گروه دریافت‌کننده ۵۰۰ mg/kg دی‌اتیل‌هگزایل‌فتالات در هنگام بلوغ

(به ترتیب $p=0.012$ و $p=0.036$) افزایش نشان داد. این میانگین در سایر گروه‌های در معرض نیز افزایش یافت اما در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

بحث

ناباروری یکی از مشکلات مهم بهداشتی-درمانی همه جوامع

استرادیول می‌گردد.^{۳۳} کاهش تعداد کلی فولیکول‌های سالم تخمدانی و نیز کاهش قطر فولیکول‌های ثانویه و آنترال، کاهش معنی‌دار وزن تخمدان نوزادان گروه دریافت‌کننده ۵۰۰mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات را توجیه می‌کند. از این‌رو، می‌توان نتیجه گرفت که دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات با کاهش تعداد کلی فولیکول‌های سالم موجود در تخمدان می‌تواند موجب کاهش کارایی تولیدمثلی نوزادان موش‌های صحرایی در هنگام بلوغ شود. گزارش Lamb در هنگامی که موش‌های ماده در معرض دوز ۱۴۰mg/kg در روز دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات به مدت ۱۲۶ روز قرار می‌گیرند وزن کل تخمدان‌ها، اویداکت و رحم به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.^{۲۴} این در حالی است که تجویز زیرپوستی ۱۰-۱۰۰ml/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات در روزهای یک، پنج، ۱۰ و ۲۱ پس از تولد در موش‌های صحرایی ماده هیچ‌گونه تغییری در وزن تخمدان‌ها ایجاد نمی‌کند.^{۲۵} همچنین، Grande دریافت که در هیچ‌یک از دوزهای مورد استفاده دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات تغییری در وزن بدن و تخمدان‌های موش‌های صحرایی ماده جوان مشاهده نمی‌شود.^{۳۳} مطالعه حاضر و بررسی مطالعات مختلف انجام شده در خصوص اثرات تولیدمثلی و تکاملی دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نشان می‌دهد که دوز مورد استفاده، زمان و طول دوره در معرض قرارگیری، نحوه تجویز و گونه حیوان بر روی نتایج حاصل از این مطالعات مؤثر می‌باشد. در همین راستا مؤسسه ایمنی شیمیایی میتسوبیشی (۲۰۰۳) گزارش می‌دهد که تجویز دوزهای ۱۰۰ و ۵۰۰mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات با روش گاوچ به مدت ۶۵ هفته در میمون‌های مارموزت به‌صورت وابسته به دوز موجب افزایش وزن تخمدان و رحم می‌شود.^{۲۶} به‌طور کلی، مطالعه حاضر حاکی از بروز تغییرات ساختاری در تخمدان نوزادان گروه دریافت‌کننده دوز بالای دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات مدت‌ها پس از پایان دوره در معرض قرارگیری مادران می‌باشد. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت که دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات به‌صورت وابسته به دوز تکامل پس از تولد ساختار بافتی تخمدان موش‌های صحرایی که مادران آن‌ها طی دوره شیردهی در معرض این ماده بوده‌اند را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش باروری و کارایی تولیدمثلی آن‌ها می‌شود. البته مطالعه دقیق‌تر برگشت‌پذیری اثرات دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات نیازمند افزایش طول دوره مطالعه می‌باشد. سپاسگزاری: بدین‌وسیله از شورای پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر تأمین بودجه پژوهشی مورد نیاز تشکر می‌گردد.

تغییر می‌کند. کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه و آنترال و نیز کاهش تعداد اجسام زرد در تخمدان نوزادان موش‌های صحرایی گروه دریافت‌کننده ۵۰۰mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات حاکی از کاهش روند فولیکولوژنز و نیز کاهش وقوع اوولاسیون در آن‌ها می‌باشد. Lovekamp نشان داد که در تخمدان موش‌های صحرایی اسپراگو دالی بالغی که در معرض دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات با دوز دو گرم بر کیلوگرم به مدت یک تا ۱۲ روز قرار داده شدند، جسم زردی مشاهده نشده و فولیکول‌های تخمدانی کیستی می‌شوند.^{۱۱} Takai نیز کاهش تعداد اجسام زرد هنگام تجویز ۳۰۰۰mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات به مدت چهار هفته را مشاهده نمود.^{۲۱} روند فولیکولوژنز در موش‌های صحرایی از روز چهارم پس از تولد با کامل شدن تشکیل فولیکول‌های آغازی در روز سوم پس از تولد و شروع تبدیل آن‌ها به فولیکول‌های اولیه آغاز می‌شود.^{۲۲} چنین به نظر می‌رسد که دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات موجب کاهش تبدیل فولیکول‌های آغازی به فولیکول‌های اولیه و نهایتاً سایر مراحل تکاملی فرآیند فولیکولوژنز شده و به این ترتیب مراحل اولیه روند تکامل فولیکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این، افزایش وابسته به دوز تعداد فولیکول‌های آرتیک نشان‌دهنده کاهش جمعیت فولیکول‌های سالم موجود در تخمدان نوزادان موش‌های صحرایی در معرض دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات می‌باشد. Grande نشان داد در موش‌های صحرایی ماده جوانی که از روز شش آبتنی تا روز ۲۱ شیردهی با روش گاوچ در معرض دوزهای پایین (۰/۱۵، ۰/۴۵، ۰/۱۳۵ و ۰/۴۰۵mg/kg) و دوزهای بالای (پنج، ۱۵، ۴۵، ۱۳۵ و ۴۰۵mg/kg) دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات قرار داده شده‌اند، تعداد فولیکول‌های آرتیک ثالثیه در دوز ۴۰۵mg/kg به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد.^{۱۳} Takai دریافت که تجویز دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات با دوزهای ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰mg/kg با روش گاوچ به مدت دو یا چهار هفته موجب افزایش تعداد فولیکول‌های آرتیک بزرگ در دوز ۱۰۰۰ و بیشتر می‌شود.^{۲۱} علاوه بر این، Lovekamp کاهش قطر فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری به‌دلیل کاهش ضخامت سلول‌های گرانولوزا، کاهش سطح استرادیول سرم، طولانی شدن چرخه استروس و عدم اوولاسیون در گروه در معرض دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات را گزارش نمود.^{۱۱} همچنین، Svechnikova دریافت که تجویز دوز ۵۰۰mg/kg دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات با روش گاوچ به مدت ۱۰ روز منجر به کاهش سطح سرمی پروژسترون و

References

- Nielsen L, Baatrup E. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquat Toxicol* 2006;80(2):140-8.
- Lopez J. Endocrine-disrupting chemical pollution: why the EPA should regulate these chemicals under the clean water act. *Sustainable Development Law and Policy* 2010:19-22.
- Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103(6):582-7.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2004;112(3):331-8.
- Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, et al. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci* 2006;93(1):164-71.
- Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;29(3):327-57.
- Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;113(5):e429-34.
- Kurahashi N, Kondo T, Omura M, Umemura T, Ma M, Kishi R. The effects of subacute inhalation of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats. *J Occup Health* 2005;47(5):437-44.
- Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16(5):529-653.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003;111(2):139-45.
- Aldyreva MV, Klimova TS, Iziumova AS, Timofeevskaja LA. The effect of phthalate plasticizers on the generative function. *Gig Tr Prof Zabol* 1975;(12):25-9.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;128(2):216-23.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* 2007;229(1-2):114-22.
- Gray LE Jr, Laskey J, Ostby J. Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol Sci* 2006;93(1):189-95.
- Durmaz E, Ozmert EN, Erkekoglu P, Giray B, Derman O, Hincal F, et al. Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics* 2010;125(1):e122-9.
- Bolon B, Bucci TJ, Warbritton AR, Chen JJ, Mattison DR, Heindel JJ. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fundam Appl Toxicol* 1997;39(1):1-10.
- Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, et al. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 2000;141(7):2614-23.
- Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 2004;127(5):569-80.
- Céspedes R, Lacorte S, Ginebreda A, Barceló D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Anal Bioanal Chem* 2006;385(6):992-1000.
- Brooks DE. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 1983;36(3):205-21.
- Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J, Iwata Y, Matsuo S, Suzuki M, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009;34 Suppl 1:SP111-9.
- Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 1992;194(3):177-92.
- Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol* 2007;194(3):603-9.
- Lamb JC 4th, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;88(2):255-69.
- Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J. Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 1989;26(1):39-59.
- Mitsubishi Chemical Safety Institute. Sixty-five week repeated oral dose toxicity study of Di(2-ethylhexyl)Phthalate (DEHP) in juvenile common marmosets. Japan: Ibaraki, 2003.

Developmental effects of Di 2 ethylhexylphthalate on ovarian follicles in Wistar rats

Received: May 23, 2010 Accepted: September 07, 2010

Abstract

Mehran Dorostghoal PhD.*
Ahmad Ali Moazedi PhD.
Elham Ghalambaz MSc.

Department of Biology, Faculty of
Sciences, Shahid Chamran
University of Ahwaz, Ahwaz, Iran

Background: In the recent years, concerns have been raised about the incidence of reproductive disorders in human populations. The present study was aimed to determine the effects of maternal exposure to Di 2 ethylhexylphthalate (DEHP) on postnatal development of ovary in Wistar rat offsprings.

Methods: Forty female Wistar rats were randomly divided in four equal experiment groups; an oil vehicle group and three DEHP-treated groups that received 10, 100 and 500 mg/kg/day Di 2 ethylhexylphthalate by gavage during lactation, respectively. The ovaries of pups were removed at 60 days of postnatal development; their weights recorded and fixed in Bouin's solution; subsequently 6 µm serial paraffin sections were stained with haematoxylin-eosin; the structural changes of ovarian follicles and corpora lutea were studied.

Results: There was no significant difference on mean body weights of offsprings among different groups. However, the mean of ovary weight was decreased significantly ($p=0.037$) in 500 mg/kg/day DEHP group. Significant decreases were seen in mean number of primary follicles ($p=0.012$) and mean number and diameter of secondary ($p=0.023$ and $p=0.012$, respectively) and antral ($p=0.025$ and $p=0.018$, respectively) follicles in high dose DEHP-treated group compared to sham group. Also, mean number of corpora lutea decreased significantly ($p=0.023$) at 60 days of age in ovary of offspring in 500 mg/kg/day DEHP group. Moreover, significant increases were seen in number of atretic follicles in moderate ($p=0.012$) and high ($p=0.036$) DEHP-treated groups.

Conclusion: Present study showed that maternal exposure to Di 2 ethylhexylphthalate during lactation affects postnatal development of ovary in offspring Wistar rats and reduces their fertility and reproductive efficiency at puberty.

Keywords: Di 2 ethylhexylphthalate, fertility, ovarian follicles, postnatal development.

* Corresponding author: Dept. of Biology,
Faculty of Sciences, Shahid Chamran
University of Ahwaz, Ahwaz, Iran.
Tel: +98-611-3331045
email: mdorostghoal@yahoo.com