

ارزیابی تیمار نوزادی مایکوتوکسین های زیرالنون و آلفازیرالنول بر بلوغ و عملکرد تولیدمثلی موش های سوری ماده

رحمت اله پرندین^۱، مرتضی بهنام رسولی^{۱*}، ناصر مهدوی شهری^۱

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۸

چکیده

مقدمه: مطالعات نشان داده اند که تجویز ترکیبات شبه استروژنی در دوره های بحرانی و حساس زندگی می تواند اثرات سوئی را بر تکوین و عملکرد سیستم تولیدمثلی داشته باشند. در این تحقیق، اثرات تیمار نوزادی مایکو استروژن های زیرالنون و آلفازیرالنول بر زمانبندی آغاز بلوغ و شاخصه های تولیدمثلی از قبیل چرخه استروس و محتوی فولیکولی تخمدان در موش های سوری ماده بررسی گردید.

مواد و روش ها: نوزادان در روزهای ۱ تا ۵ پس از تولد با روش زیرجلدی با روغن کنجد، استرادیول بنزوات (۲۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن)، زیرالنون (۰/۲، ۱ و ۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و آلفازیرالنول (۰/۲، ۱ و ۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) تیمار شدند. موش های کنترل بدون تیمار بودند. بازشدگی واژن (نشانه آغاز بلوغ) و چرخه استروس از روزهای ۲۳ تا ۷۰ پس از تولد بررسی شدند. به علاوه حیوانات در روز ۷۰ پس از تولد کشته شده و خون و تخمدان آن ها جمع آوری شد.

یافته های پژوهش: بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس و کاهش محتوی فولیکولی تخمدان ها به طور معنی داری در گروه های استرادیول بنزوات، ۰/۲ و ۱ زیرالنون و ۰/۲ و ۱ آلفازیرالنول مشاهده گردید. همین طور سطوح هورمون های استرادیول و LH مختل گردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج تیمار نوزادی موش های ماده با مایکو استروژن ها منجر به بلوغ زودرس همراه با اختلال عملکرد تولیدمثلی گردید. این تغییرات می توانند به علت نقصان در برخی اجزای محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد به ویژه نورون های حساس به استروژن در هیپوتالاموس باشند.

واژه های کلیدی: زیرالنون، تولیدمثلی، بلوغ، موش سوری ماده

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

مقدمه

ترکیبات مداخله گر اندوکرینی (EDCs) گروهی از ترکیبات طبیعی یا ساخت بشر را تشکیل می دهند که در تکوین و فیزیولوژی بافت های حساس به هورمون ها به ویژه هورمون های استروئیدی دخالت می کنند. این ترکیبات در بسیاری از محصولات صنایع پلاستیک سازی، بطری های نوشیدنی، ظروف یک بار مصرف، محصولات آرایشی و بهداشتی و فیتو استروژن ها یافت می شوند (۳-۱). تکوین و فیزیولوژی سیستم تولیدمثلی جنس ماده نسبت به اثرات مضر این قبیل ترکیبات محیطی بسیار حساس می باشد (۴،۱). تاکنون مطالعات مختلفی در ارتباط با اثرات زیان آور EDC ها بر اعمال تولیدمثلی جوندگان ماده، از جمله تغییر در سن آغاز بلوغ، اختلال در چرخه استروس، تغییرات هورمونی، نقص عملکرد تخمدان و برخی انواع نابرابوری صورت گرفته است (۴-۶). این اختلالات در پستانداران ممکن است نه تنها به علت ایجاد نقص در گنادها به وجود آید، همین طور می تواند ناشی از ایجاد اختلال در جمعیت های نورونی کلیدی کنترل کننده محور تولیدمثلی در هیپوتالاموس باشد (۵). با این حال هنوز علت دقیق مکانیسم های موثر در ایجاد اختلالات تولیدمثلی توسط EDC ها به ویژه در جنس ماده تعیین نشده است.

مایکواستروژن زیرالنون یک محصول سمی طبیعی حاصل از قارچ های جنس فوزاریوم می باشد که به طور وسیعی در سراسر جهان به عنوان آلوده کننده بسیاری از محصولات کشاورزی از قبیل ذرت، گندم، جو، برنج و سایر غلات شناخته می شوند (۷-۹). حضور این ترکیبات در محصولات غذایی انسان و دام ها به عنوان یک عامل بالقوه زیان آور بر سلامتی به ویژه سلامتی تولیدمثلی گزارش شده اند (۹،۱۰). اثرات سمی زیرالنون ناشی از فعالیت استروژنی آن به واسطه شباهت زیاد ساختار مولکولی آن با هورمون استرادیول می باشد. بر اساس مطالعات مولکولی و یافته های حاصل از تمایل اتصالی EDC ها به گیرنده های استروژنی، زیرالنون و مشتقات آن قوی ترین استروژن های برونزاد طبیعی هستند (۱۱،۱۰). مطالعات قبلی نشان داده اند که زیرالنون قابلیت انتقال به شیر را دارد

و در شیر گاو مشاهده شده است. همین طور زیرالنون می تواند توسط باران از مزارع به سیستم های آبی منتقل شده و در دسترس انسان ها و دام ها قرار گیرد (۱۳،۱۲). زیرالنون حدود ۳۰ دقیقه پس از ورود به بدن از راه دهان، در خون مشاهده می شود. زیرالنون در خون همانند استروژن ها به گلوبولین ها متصل شده و در دسترس بافت های حساس به استروژن از جمله بافت پستان، رحم، تخمدان و مغز قرار می گیرد (۱۵،۱۴). زیرالنون و مشتقات آن یعنی آلفا و بتا زیرالنول با استرادیول بر سر جایگاه های ویژه اتصالی گیرنده های استروژنی رقابت می کنند. تمایل اتصالی زیرالنون با بافت های هدف به مقدار ۱۰-۱ درصد استرادیول می باشد در صورتی که تمایل اتصالی برای آلفا زیرالنول بیشتر و برای بتا زیرالنول کمتر از این مقدار می باشد (۱۶،۱۱).

این ترکیبات به عنوان عامل هیپر استروژنیسم و نابرابوری در انسان ها و دام ها شناخته شده اند. تاثیرات زیان آور زیرالنون بر تولیدمثلی جوندگان ماده با تداخل این ترکیبات با گیرنده های استروژنی گزارش شده است (۱۹-۱۷). مطالعات نشان داده اند که تجویز مادرزادی یا پیش از بلوغ زیرالنون دارای اثرات زیان آوری بر شروع بلوغ، چرخه استروس و باروری جوندگان ماده می باشد (۲۲-۲۰).

دوره نوزادی به عنوان یک دوره بسیار حساس اندوکرینی می باشد که در طی آن بافت های محور تولیدمثلی به استروژن ها و ترکیبات مداخله گر اندوکرینی شبه استروژنی به شدت حساس می باشند (۲۳). با این وجود تاکنون مطالعه دقیقی در ارتباط با تاثیر زیرالنون و آلفا زیرالنول در دوره نوزادی بر پارامترهای تولیدمثلی جنس ماده صورت نگرفته است. بنا بر این در این تحقیق، ما اثرات تجویز نوزادی زیرالنون و آلفا زیرالنول را بر زمانبندی آغاز بلوغ، چرخه استروس و فولیکول زایی تخمدان در موش های کوچک آزمایشگاهی بررسی کردیم.

مواد و روش ها

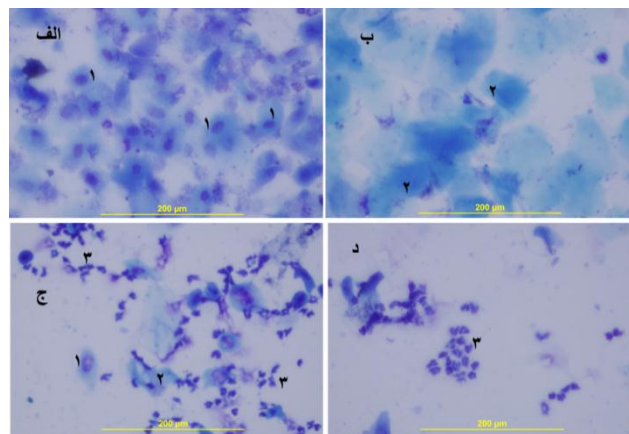
حیوانات: موش های سه ماهه باردار نژاد BALB/c از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد خریداری شده و به حیوانخانه دانشکده علوم

شدند. در جوندگان آغاز بلوغ توسط باز شدن واژن به عنوان یک نشانه مناسب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد(HPG) تعیین می گردد که در حدود ۵ هفته پس از تولد در موش های آزمایشگاهی مشاهده می شود. جهت بررسی چرخه استروس، اولین استروس در موش ها با مشاهده سلول های شاخی شده در حدود ۲ تا ۱۰ روز پس از مشاهده باز شدن واژن اتفاق می افتد(۲۴). چرخه استروس به صورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مشاهده اسمیر واژن تا روز ۷۰ پس از تولد بررسی شد. به طور خلاصه، اسمیرهای واژن از موش های ماده با استفاده از سوپ آغشته با محلول NaCl ۰/۹ به دست آمد و بر روی لام شیشه ای تمیز گسترش تهیه شد و با رنگ متیلن بلو(سیگما) ۱ درصد رنگ آمیزی شد و سپس تحت میکروسکوپ نوری(Olympus Bx51، ژاپن) مشاهده انجام شد. چرخه استروس کامل در موش ها ظرف مدت ۴ تا ۵ روز اتفاق افتاده و به ۴ مرحله به صورت زیر تقسیم می شود: ۱-مرحله پرواستروس، که در طی آن سلول های پوششی هسته دار غالب هستند. ۲-مرحله استروس، این مرحله با حضور سلول های پوششی شاخی شده بدون هسته مشخص می شود. ۳-مرحله مت استروس، که در این مرحله مخلوطی از انواع سلول ها شامل لوکوسیت ها، سلول های پوششی هسته دار و سلول های پوششی شاخی شده مشاهده می گردد. ۴-مرحله دی استروس، که در این مرحله لوکوسیت ها غالب هستند(شکل شماره ۱)(۲۵).

دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی و دمای 21 ± 1 درجه سانتی گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. همه آزمایش ها در محل آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام شدند.

تیمار نوزادی و طراحی آزمایش: موش های ماده باردار اجازه یافتند تا نوزادان خود را به طور طبیعی به دنیا آورند. موش های نوزاد به طور تصادفی به ۹ گروه ۶ تا ۸ تایی به صورت زیر تقسیم شدند: گروه کنترل(بدون تیمار)، گروه شم(۰/۰۵ میلی لیتر روغن کنجد، سیگما)، گروه ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن استرادیول بنزوات(کنترل مثبت، سیگما)، سه گروه زیرالنون(سیگما) به ترتیب با دوزهای ۰/۲، ۱ و ۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن(۰/۲، ۱ و ۲ زیرالنون) و سه گروه آلفازیرالنول(سیگما) به ترتیب با دوزهای ۰/۲، ۱ و ۲ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن(۰/۲، ۱ و ۲ آلفازیرالنول) تقسیم شدند. ترکیبات در روغن کنجد حل شده و به روش زیرجلدی با استفاده از سرنگ همیلتون به پشت گردن نوزادان در روزهای ۱ تا ۵ پس از تولد و در هر روز یک نوبت تجویز شدند. همه نوزادان روزانه جهت تیمار دقیق و بررسی سلامتی حیوانات وزن شدند.

بررسی آغاز بلوغ و چرخه استروس: موش ها در روز ۲۱ پس از تولد از شیر مادر محروم شدند و از روز ۲۴ پس از تولد روزانه جهت مشاهده بازشدگی واژن بررسی



شکل شماره ۱. سیتولوژی مراحل مختلف چرخه استروس موش. الف) پرواستروس ب) استروس ج) مت استروس د) دی استروس. ۱) سلول پوششی هسته دار ۲) سلول پوششی شاخی شده بدون هسته ۳) لوکوسیت ها

جمع آوری بافت و سرم: همه موش ها با تجویز کتامین/زایلازین (شرکت آلفاسن هلند) در حدود روز ۷۰ پس از تولد در مرحله دی استروس عمیقاً بی هوش شده و خون آن ها از قلب جدا شد. پس از لخته شدن خون، پلاسما را با سانتریفیوژ جداسازی کرده و در دمای ۷۰- تا زمان سنجش هورمونی نگهداری شد. پس از بی هوشی عمیق و برداشت خون، موش ها با فرمالین ۱۰ درصد (سیگما) از راه بطن چپ پرفیوژ شدند. در ادامه تخمدان ها خارج شده و پس از وزن شدن با استفاده از یک ترازوی دیجیتال (Sartorius، آلمان)، در فرمالین ۱۰ درصد برای مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد مجدداً تثبیت شدند.

مطالعه مرفولوژیکی فولیکول های تخمدان: جهت تعیین تعداد انواع فولیکول ها در تخمدان، ابتدا تخمدان ها با استفاده از الکل با درجات صعودی آبیگری شده، سپس با استفاده از پارافین (Merck، آلمان) قالبگیری و در ادامه توسط میکروتوم (Leitz 1512، اتریش) برش هایی سریالی با ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. برش ها سپس با استفاده از رنگ همتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند و در پایان لام های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ (Olympus Bx51، ژاپن) با بزرگ نمایی های مختلف و با کمک دوربین (Olympus DP71) مشاهدات صورت گرفت. دهمین و بیستمین برش های سریالی در کل تخمدان به ترتیب جهت شمارش فولیکول های کوچک تر (فولیکول های نخستین، اولیه و ثانویه) و بزرگ تر (فولیکول های آنترال، آترزی، فولیکول گراف و اجسام زرد) به کار رفت. فولیکول های نخستین با داشتن یک اووسیت احاطه شده توسط یک لایه از سلول های گرانولوزای شاخی شده (مسطح) مشخص می شوند. فولیکول های اولیه دارای

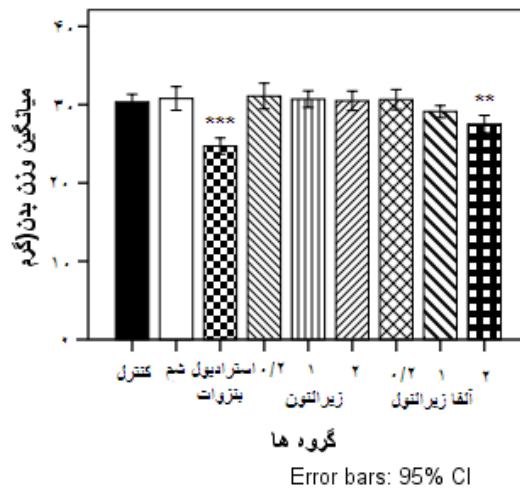
یک اووسیت احاطه شده توسط یک لایه از سلول های گرانولوزای مکعبی شکل مشخص می شوند. فولیکول های ثانویه توسط بیش از یک لایه از سلول های گرانولوزای مکعبی احاطه شده اند که در لایه لای این سلول ها فضای آنتروم مشاهده نمی شود. فولیکول های آنتروم دارای فضای آنتروم و لایه سلول های گرانولوزای متراکم هستند. اجسام زرد که فقط پس از تخمک گذاری تشکیل می شوند و حاوی سلول های لوتئینی می باشند. فولیکول های آترزی دارای ساختارهای غیرطبیعی مثل مایع فولیکولی متراکم، تخمک تحلیل رفته، لایه های سلولی گرانولوزای ضخیم یا پر شده با مواد فیبرینی در آنتروم هستند (۲۸-۲۶).

سنجش هورمون ها: اندازه گیری غلظت هورمون های استرادیول و لوتئینی (LH) با روش سنجش ایمنی رادیواکتیو (R.I.A) توسط دستگاه گاماکانتر مطابق با پروتوکل کیت های مربوطه (Radim، ایتالیا) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها: تحلیل داده ها با آزمون واریانس یک طرفه one-way ANOVA و Tukeyes و با استفاده از نرم افزار تکمیلی SPSS vol. 19 انجام شد. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین (Mean \pm SEM) و سطح معنی دار در محدوده اطمینان ۹۵ درصد بیان گردید.

یافته های پژوهش

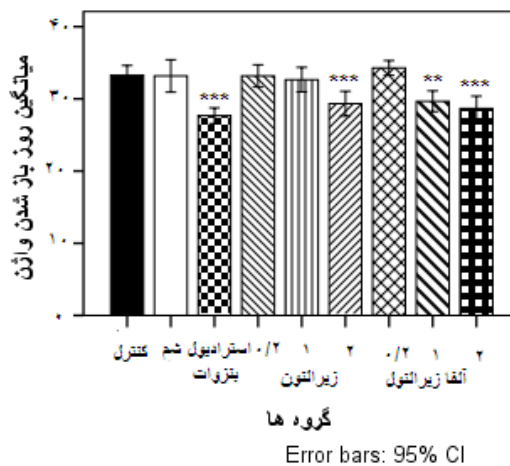
یافته های وزن بدن: نتایج ثبت وزن بدن در موش های ۷۰ روزه کاهش معنی داری را در گروه های استرادیول بنزوات ($P < 0.001$) و ۲ آلفازیرالنول ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) وزن بدن در موش های ۷۰ روزه. $n=6-8$ ، $***P<0.001$ و $**P<0.01$ در مقایسه با گروه کنترل).

یافته های آغاز بلوغ: در حالی که میانگین روز باز شدن واژن در موش های گروه کنترل ۳۳/۲ روز پس از تولد بود، این مقدار در گروه های استرادیول بنزوات (۲۷/۶۷)، ۲ زیرالنون (۲۹/۳۳)، ۱ آلفازیرالنول

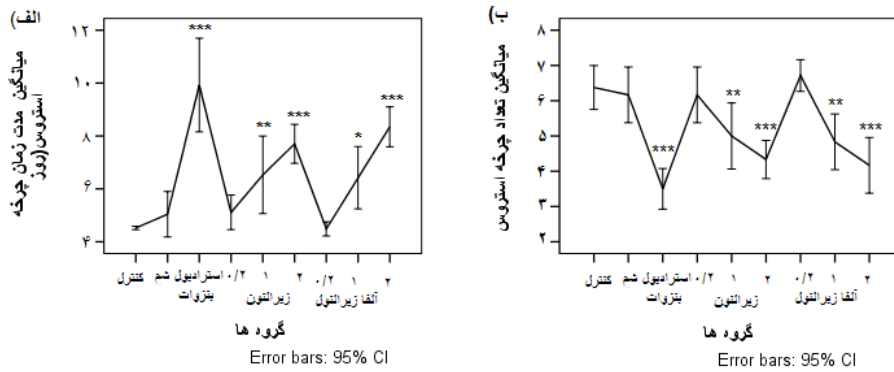
شماره ۳ و ۲ آلفازیرالنول (۲۹/۶۷) بود، که طبق شکل شماره ۳ به طور معنی داری نشان دهنده بلوغ زودرس در این گروه ها در مقایسه با گروه کنترل بود.



شکل شماره ۳. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) آغاز بلوغ (باز شدن واژن) در موش ها. $n=6-8$ ، $***P<0.001$ و $**P<0.01$ در مقایسه با گروه کنترل).

یافته های چرخه استروس: بررسی چرخه استروس در موش ها نشان داد که میانگین طول مدت این چرخه در گروه های استرادیول بنزوات ($P<0.001$)، ۱ زیرالنون ($P<0.01$)، ۲ زیرالنون ($P<0.001$)، ۱ آلفازیرالنول ($P<0.01$) و ۲ آلفازیرالنول ($P<0.001$) کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل داشته است (شکل شماره ۴).

نشان داد که تعداد این چرخه ها به طور معنی داری در گروه های استرادیول بنزوات ($P<0.001$)، ۱ زیرالنون ($P<0.01$)، ۲ زیرالنون ($P<0.001$)، ۱ آلفازیرالنول ($P<0.01$) و ۲ آلفازیرالنول ($P<0.001$) افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل داشته است. همین طور بررسی تعداد چرخه های استروس



شکل شماره ۴. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) الف) طول مدت چرخه استروس (ب) تعداد چرخه استروس. شکل شماره ۴. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) الف) طول مدت چرخه استروس (ب) تعداد چرخه استروس. $n=6-8$, $***P<0.001$, $**P<0.01$ و $*P<0.05$ در مقایسه با گروه کنترل).

در صورتی که در سایر گروه ها تغییر معنی داری با گروه کنترل نشان ندادند. تعداد فولیکول های نخستین، اولیه، ثانویه، آنترال، فولیکول گراف و اجسام زرد در گروه های استرادیول بنزوات، ۱ زیرالنون، ۲ زیرالنون، ۱ آلفازیرالنول و ۲ آلفازیرالنول کاهش معنی دار را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. هم چنین در همین گروه ها تعداد فولیکول های آنترزی در مقایسه با موش های کنترل افزایش معنی دار را نشان دادند.

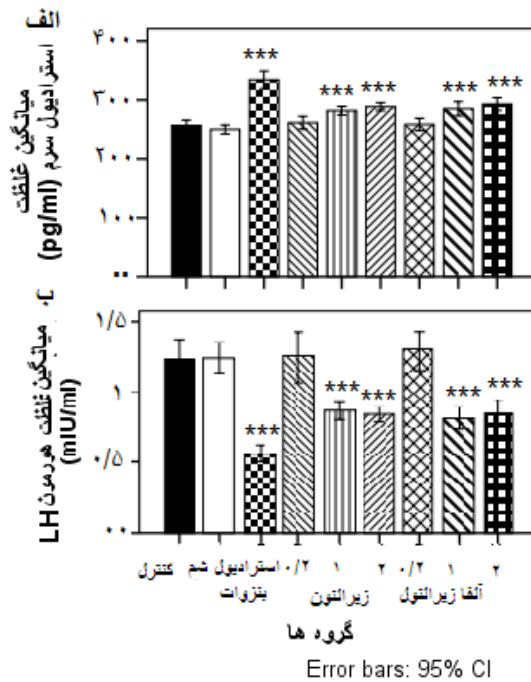
یافته های شمارش فولیکول های تخمدان: جدول شماره ۱ نتایج تاثیر تیمار نوزادی زیرالنون و آلفازیرالنون را بر وزن تخمدان و تعداد فولیکول های تخمدان در موش های ۷۰ روزه نشان می دهد. وزن تخمدان نسبت به وزن بدن به طور معنی داری در گروه های استرادیول بنزوات ($P<0.001$), ۱ زیرالنون ($P<0.001$), ۲ زیرالنون ($P<0.001$), ۱ آلفازیرالنول ($P<0.01$) و ۲ آلفازیرالنول ($P<0.001$) کاهش یافت،

جدول شماره ۱. تاثیر تیمارهای نوزادی زیرالنون و آلفا زیرالنون بر محتوی فولیکول های تخمدان موش ها. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) تعداد انواع فولیکول ها. $aP<0.001$, $bP<0.01$ و $aP<0.01$ در مقایسه با گروه کنترل).

گروه ها	وزن تخمدان/ وزن بدن × ۱۰۰	فولیکول های نخستین	فولیکول های اولیه	فولیکول های ثانویه	فولیکول های آنترال	فولیکول گراف	فولیکول های آنترزی	اجسام زرد
کنترل	۰/۰۰۱±۰/۰۴۲	۶/۰۳±۲۳۴/۱۲	۲/۱۲±۷۷/۰۰	۱/۴۳±۶۵/۳۷	۱/۴۶±۴۴/۶۲	۰/۸۹±۱۰/۰۰	۰/۵۳±۴/۲۵	۱/۳۵±۴۵/۶۲
شم	۰/۰۰۱±۰/۰۴۴	۵/۲۸±۲۳۳/۳۳	۲/۹۳±۷۳/۵	۱/۶۹±۶۳/۶۷	۱/۶۶±۴۳/۸۳	۰/۷۶±۹/۳۳	۰/۷۱±۳/۶۷	۱/۶۷±۴۴/۶۷
استرادیول بنزوات	۰/۰۰۱±۰/۰۳۰	۸/۰۰±۱۵۵/۶۷	۱/۹۳±۴۷/۵	۲/۱۲±۳۸/۱۷	۱/۶۰±۳۳/۳۳	۰/۷۱±۳/۳۳	۱/۰۸±۱۱/۶۷	۱/۲۶±۱۴/۵۰
زیرالنون ۲	۰/۰۰۲±۰/۰۴۵	۳/۴۳±۲۰۹/۵۰	۱/۹۶±۶۹/۶۷	۱/۶۶±۶۶/۸۳	۱/۷۱±۴۳/۰۰	۰/۵۶±۸/۳۳	۰/۸۰±۵/۳۳	۱/۰۹±۴۱/۵۰
زیرالنون ۱	۰/۰۰۲±۰/۰۳۴	۲/۹۸±۱۷۵/۸۳	۱/۵۶±۶۵/۶۷	۲/۰۶±۵۴/۰۰	۱/۵۴±۴۰/۶۷	۰/۵۶±۶/۵۰	۰/۷۰±۵/۱۷	۱/۵۸±۳۳/۱۷
زیرالنون ۲	۰/۰۰۱±۰/۰۳۲	۳/۵۹±۱۸۰/۵۰	۲/۳۲±۵۶/۶۷	۲/۰۴±۵۰/۱۷	۰/۹۴±۳۸/۸۳	۰/۷۳±۶/۰۰	۰/۵۶±۸/۳۳	۱/۳۰±۲۷/۱۷
آلفازیرالنول ۲	۰/۰۰۱±۰/۰۴۰	۳/۱۲±۵۷/۱۸۹	۲/۱۰±۷۰/۰	۱/۵۹±۵۵/۴۳	۰/۹۲±۴۰/۴۳	۰/۴۹±۹/۰	۰/۵۶±۲/۲۸	۱/۵۳±۴۰/۰
آلفازیرالنول ۱	۰/۰۰۱±۰/۰۳۶	۳/۸۲±۱۸۱/۳۳	۱/۶۷±۶۱/۱۷	۲/۴۱±۵۵/۸۳	۱/۱۵±۳۸/۰	۰/۶۷±۶/۶۷	۰/۴۳±۷/۵۰	۲/۱۳±۳۲/۸۳
آلفازیرالنول ۲	۰/۰۰۱±۰/۰۳۴	۴/۶۲±۱۷۴/۶۷	۱/۹۸±۵۲/۵	۱/۲۶±۴۹/۰	۱/۵۸±۳۲/۸۳	۰/۳۴±۵/۵۰	۰/۵۶±۸/۵۰	۳/۵۷±۲۸/۵

در مقایسه با گروه کنترل افزایش را نشان می دهند. به علاوه غلظت هورمون LH در همین گروه ها به طور معنی داری ($P<0.001$) در مقایسه با موش های گروه کنترل کاهش را نشان می دهند.

یافته های هورمون سنجی: چنان چه در شکل شماره ۵ مشاهده می شود، غلظت استرادیول در گروه های استرادیول بنزوات، ۱ زیرالنون، ۲ زیرالنون، ۱ آلفازیرالنول و ۲ آلفازیرالنول به طور معنی داری



شکل شماره ۵. میانگین و خطای استاندارد (Mean±SEM) تغییرات غلظت هورمون های الف) استرادیول و ب) LH. در مقایسه با گروه کنترل. (***) $P < 0.001$, $n = 6-8$.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه کنونی حکایت از تغییرات معنی دار پارامترهای مختلف تولیدمثلی موش های ماده از جمله بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس، کاهش انواع فولیکول های تخمدان و تغییرات فیدبکی هورمون های استرادیول و LH به دنبال تجویز نوزادی زیرالنون و آلفازیرالنول مشابه با تیمار استرادیول بنزوات دارد. باز شدن واژن در گروه های استرادیول بنزوات، ۲ زیرالنون، ۱ آلفازیرالنول و ۲ آلفازیرالنول به طور معنی داری زودتر اتفاق افتاد. باز شدن واژن یک تظاهر بیرونی آغاز بلوغ در جوندگان است که تحت تاثیر EDC ها قرار می گیرد (۲۹،۳۰). مطالعات قبلی نشان داده اند که تجویز مازدادی (۲۰) و همین طور پیش از بلوغ موش ها (۲۱،۲۲) با زیرالنون موجب جلو افتادن بازشدگی واژن در این حیوانات می شود. همین طور تیمار ترکیبات مداخله گر استروژنیک دیگر از قبیل دی اتیل استیل بسترول (DES) و فیتواستروژن جنیستین نتایج مشابهی را به دنبال داشته اند (۲۲-۲۳، ۳۱). نتایج بررسی های اپیدمیولوژیکی انسانی بیماران با بلوغ زودرس با علل ناشناخته نشان داده که این بیماران در

معرض مصرف غذاهای آلوده به زیرالنون بوده اند و همین طور میزان زیرالنون سرم در این بیماران در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود (۳۲،۳۳). در برخی مطالعات (۳۴،۳۵) پیشنهاد شده که بلوغ زودرس می تواند ناشی از افزایش وزن بدن باشد که با توجه به نتایج شکل شماره ۲ در موش های این تحقیق افزایش وزن در هیچ گروهی مشاهده نشد و حتی در گروه ۲ آلفازیرالنول مشابه با گروه استرادیول بنزوات میانگین وزن بدن کاهش یافت. اثرات آنورکتیک (بی اشتها کننده) استرادیول شناخته شده است (۳۶) که در این تحقیق به نظر می آید، این ترکیبات میکواستروژنیک با دوزهای استفاده شده به استثنای ۲ آلفازیرالنول قادر به تغییر وزن بدن مشابه با استرادیول بنزوات نیستند. جدیدترین شواهد نشان داده اند که نوروپپتید کیس پپتین که در هسته های هیپوتالاموسی AVPV و ARC بیان می شود در تنظیم زمانبندی بلوغ، یک نقش اساسی را ایفا می کند. نوروپپتید کیس پپتین در بالادست نوروهای GnRH قرار داشته و با تنظیم ترشح GnRH در فعالسازی محور تولیدمثلی هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد نقش محوری خود را در

استروژن در هسته های هیپوتالاموسی کنترل کننده چرخه تولیدمثل به ویژه جمعیت نورونی کیس پپتین و کاهش هورمون لوتئینی باعث اختلال در چرخه استروس در موش ها شده باشند.

تیمار نوزادی موش ها در گروه های استرادیول بنزوات، ۱ زیرالنون، ۲ زیرالنون، ۱ آلفازیرالنول و ۲ آلفازیرالنول منجر به کاهش تعداد انواع فولیکول های تخمدانی و افزایش فولیکول های آرتیک (تحلیل رفته) شد. این تغییر ممکن است ناشی از تاثیر مستقیم و سوء زیرالنون و آلفازیرالنون بر تکوین و تمایز فولیکول های نخستین در دوره نوزادی باشد. در مطالعات قبلی تجویز نوزادی استرادیول و EDC های مثل DES، جنیستین و بیس فنول آ اثرات مشابهی را به همراه داشته است (۴۷). مطالعات در جوندگان نشان داده اند که تشکیل و سازماندهی فولیکول های نخستین و فرآیند بعدی تبدیل آن ها به فولیکول های اولیه یک فرآیند حیاتی است (۴۸). در انسان تشکیل فولیکول های نخستین در اواخر دوران جنینی صورت می گیرد، ولی در جوندگان این فرآیند بلافاصله در چند روز اول پس از تولد صورت می گیرد (۴۹). در دوره نوزادی جوندگان ماده، به علت خاموشی تخمدان ها و همین طور به علت حضور پروتئین اتصال با استروژن بنام آلفا فتو پروتئین، در نتیجه سطوح پلاسمائی استرادیول درون زاد پایین است و همین مقدار اندک استرادیول برای تشکیل و تکوین فولیکول های نخستین حیاتی است (۴۹،۵۰). نتایج مطالعات نشان دهنده آن است که افزایش غلظت استرادیول در دوران بحرانی نوزادی منجر به کاهش تشکیل فولیکول های نخستین و کاهش تبدیل آن ها به فولیکول های اولیه شده که در نهایت با افزایش آپوپتوزیس در فولیکول ها منجر به ایجاد اختلال در تشکیل فولیکول ها می شود (۵۴-۵۱). مقدار زیرالنون در غذای دام ها از چند میکروگرم تا بیش از ۲۷۶ mg/kg و بین ۰/۰۰۱ تا ۱۷۵ mg/kg در غلات و مصارف غذائی وابسته به غلات در انسان ها، بسته به وارسته گیاه، ناحیه جغرافیائی، شرایط آب و هوائی و شرایط نگهداری غلات متفاوت می باشد (۱۷). در انسان ها، مصرف روزانه قابل تحمل (TDI) زیرالنون، ۰/۲۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن

تولیدمثل ایفا می کند. محققان نشان داده اند که موش ها یا انسان های با ژن جهش یافته کیس پپتین، هیپوگنادیسم بوده و بلوغ جنسی ندارند، که اهمیت سیستم کیس پپتین در تنظیم آغاز سن بلوغ را نشان می دهد (۳۷-۴۰). مطالعات در جوندگان نشان داده اند که پایین بودن سطح استرادیول در دوره نوزادی برای سیستم کیس پپتین یک دوره بحرانی می باشد، چرا که تیمار نوزادی استروژن ها و ترکیبات مداخله گر شبه استروژنی مثل BPA و جنیستین باعث کاهش بیان ژن و تعداد نرون های کیس پپتین در هیپوتالاموس شده که منجر به بلوغ زودرس و اختلالات تولیدمثلی در این حیوانات شده است (۳۷،۳۸،۴۱). نرون های کیس پپتین هر دو نوع گیرنده استروژنی آلفا و بتا را بیان می کنند که با توجه به خاصیت استروژنیک زیرالنون و آلفازیرالنون و گفته های فوق ممکن است که این ترکیبات در دوره نوزادی بر سیستم کیس پپتین اثرات سوء اعمال کنند و باعث بلوغ زودرس شوند.

تیمار نوزادی منجر به اختلال در چرخه استروس موش ها (افزایش مدت چرخه و کاهش تعداد چرخه ها) و کاهش غلظت هورمون لوتئینی در گروه های استرادیول بنزوات، ۱ زیرالنون، ۲ زیرالنون، ۱ آلفازیرالنول و ۲ آلفازیرالنول شد. ژائو و همکاران (۲۲) نشان دادند که تجویز پیش از بلوغ زیرالنون به موش ها منجر به اختلال در چرخه استروس می شود، که موافق با نتایج این مطالعه می باشد. نتایج مطالعات تیمار نوزادی جوندگان با استرادیول و PPT (آگونیست رسپتور آلفای استروژن) و همین طور مواجهه با EDC های شبه استروژنی مثل جنیستین و بیس فنول آ نشان داده اند که منجر به کاهش تعداد نرون های حساس به استروژن مثل کیس پپتین در هیپوتالاموس شده و منجر به اختلال در چرخه استروس در این حیوانات شده است (۴۳،۴۲). به علاوه مطالعات دیگری نشان داده اند که ایجاد آسیب و در نتیجه کاهش تعداد نرون ها در هسته های AVPV و ARC نیز با مشاهده اختلال در سیکل استروس در موش ها همراه بوده است (۴۶-۴۴). بنا بر این ممکن است که تیمار نوزادی ترکیبات استروژنیک زیرالنون و آلفازیرالنول در این تحقیق با اختلال در تکوین نرون های حساس به

تولیدمثلی در بزرگسالان گردد (۱۹-۵۸، ۵۶-۵۷). در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار نوزادی مایکواستروژن های زیرالنون و آلفازیرالنول مشابه با اثرات استرادیول بنزوات موجب بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس و کاهش تعداد فولیکول های تخمدان و به هم خوردن فیدبک استرادیول-هورمون لوتئینی در موش ها شده که این اثرات می تواند ناشی از تاثیر این ترکیبات استروژنیک در برخی اجزای محور HPG به ویژه هسته های حساس به استروژن هیپوتالاموسی کنترل کننده محور تولیدمثلی باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از یک رساله دکتری بوده و با حمایت مالی (گرات شماره ۳۲۷۵۷) دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

بدن تعیین شده است (۲۲، ۵۵). انسان ها و به ویژه نوزادان و کودکان در حال رشد، از طریق مصرف مستقیم خوراکی های آلوده به مایکوتوکسین ها مثل غلات، آرد، مکمل های غذایی کودک، بیسکوئیت و مصرف غیر مستقیم آن ها از راه زنجیره های غذایی مثل شیر و گوشت دام های آلوده به زیرالنون، به شدت در معرض عوارض این ترکیبات استروژنیک هستند. بنا بر این دریافت مقادیر بالاتر از TDI زیرالنون، ممکن است علاوه بر افزایش خطر ابتلای به سرطان های وابسته به استروژن به ویژه سرطان پستان، بر رشد و تکوین اندام های تولیدمثلی کودکان اثرات سوء بگذارد و منجر به هیپر استروژنیسم گردد. همین طور مواجهه با این ترکیبات می تواند منجر به رشد زود هنگام غدد پستانی (تلاک زودرس)، ژنیکوماستی و بلوغ زودرس نوجوانان و در نهایت ناباروری یا کاهش توانایی

References

1. Fowler PA, Bellingham M, Sinclair KD, Evans NP, Pocar P, Fischer B, et al. Impact of endocrine disrupting compounds on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355:231-9.
2. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans a review. *Med Sci Monit* 2009; 15:137-45.
3. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127: 204-15.
4. Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 Mice. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 547-52.
5. Patisaul HB, Adewale HB. Long term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav Neurosci* 2009; 3: 1-10.
6. Jefferson W, Newbold R, Padillabanks E, Pepling M. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod* 2006; 74:161-8.
7. Christensen CM, Nelson GH, Mirocha CJ. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. *Appl Microbiol* 1965; 13: 653-59.
8. Zinedine A, Soriano JM, Moltò JC, Mañes J. Review on the toxicity occurrence metabolism detoxification regulations and intake of zearalenone an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Tox* 2007; 45: 1-18.
9. Glenn AE. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 137: 213-40.
10. Lorond T, Vigh E, Garai J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds phytoestrogens and xenoestrogens. *Curr Med Chem* 2010; 17: 3542-74.
11. Kuipergoodman T, Scott PM, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 1987; 7: 253-306.
12. Prelusky DB, Scott PM, Trenholm HL, Lawrence GA. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy Cows. *J Environ Sci Health B* 1990; 25: 87-103.
13. Waskiewicz A, Gromadzka K, Bocianowski J, Pluta P, Golinski P. Zearalenone contamination of the aquatic environment as a result of its presence in crops. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012; 63: 429-35.

14. Olsen M, Pettersson H, Sandholm K, Visconti A, Kiessling KH. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro. *Food Chem Toxicol* 1987; 25:681-83.
15. Biehl ML, Prelusky DB, Koritz GD, Hartin KE, Buck WB, Trenholm HL. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 121: 152-9.
16. Fleck SC, Hildebrand AA, Muller E, Pfeiffer E, Metzler M. Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Mycotoxin Res* 2012; 28: 267-73.
17. Finkgremmels J, Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 137:326-41.
18. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 497-516.
19. Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BAJ, Finkgremmels J. Mycotoxins and female reproduction in vitro approaches. *World Mycotoxin J* 2013; 6: 245-53.
20. Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujitakyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 Mouse offspring. *Reprod. Toxicol* 2004; 18: 803-11.
21. Nikaido Y, Danbara N, Tsujitakyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 Mice. *In vivo* 2005; 19:487-94.
22. Zhao F, Li R, Xiao S, Diao H, Viveiros MM, Song X. Postweaning exposure to dietary zearalenone, a mycotoxin, promotes premature onset of puberty and disrupts early pregnancy events in female Mice. *Toxicol Sci* 2013; 132: 431-42.
23. Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* 2012; 143: 247-60.
24. Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL. The mouse in biomedical research normative biology husbandry and models. 2thed. New York Acad Publication. 2007;P. 203.
25. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in Mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009; 4: 41-6.
26. Butcher RL, Kirkpatrickeller D. Pattern of follicular growth during the four day oestrus cycle in the Rat. *Biol Reprod* 1984; 31:280-6.
27. Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reprod* 2004; 127: 569-80.
28. Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL. Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in Rats. *Fitoterapia* 2010; 81: 998-1002.
29. Stoker TE, Laws SC, Crofton KM, Hedge JM, Ferrell JM, Cooper RL. Assessment of DE-71 a commercial polybrominated diphenyl ether mixture in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicol Sci* 2004; 78: 144-55.
30. Rollerova E, Wsolova L, Urbancikova M. Neonatal exposure to herbicide acetochlor alters pubertal development in female wistar Rats. *Toxicol Mech Method* 2011; 21: 406-17.
31. Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kim TS, Kang IH, Seok JH, et al. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague dawley Rats treated with DES tamoxifen testosterone and flutamide. *Toxicol Sci* 2002; 67: 52-62.
32. Deng F, Tao FB, Liu DY, Xu YY, Hao JH, Sun Y, Su PY. Effects of growth environments and two environmental endocrine disruptors on children with idiopathic precocious puberty. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 803-9.
33. Massart F, Saggese G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *Int J Androl* 2010; 33:369-76.
34. Foster PM, McIntyre BS. Endocrine active agents: implications of adverse and non-adverse changes. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 59-65.
35. Losaward SM, Todd KL, Mccaffrey KA, Tsutsui K, Patisaul HB. Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female Rats neonatally exposed to bisphenol A. *Biol Reprod* 2012;87:28.
36. Lampert C, Arcego DM, Laureano DP, Diehl LA, Costalima IF, Krolow R, et al. Effect of chronic administration of tam-

- oxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 2013; 119: 17-24.
37. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30:713-43.
38. Anglemont X, Colledge WH. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology* 2010; 25: 207-17.
39. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1357-63.
40. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in Mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 10714-9.
41. Tenasempere M. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *Int J Androl* 2010; 33: 360-8.
42. Beale KE, Kinseyjones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, et al. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female Rats. *Endocrinology* 2014; 155: 1091-8.
43. Hu MH, Li XF, Mccausland B, Li SY, Gresham R, Kinseyjones JS, et al. Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female Rats. *Endocrinology* 2015; 156: 2619-31.
44. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001; 22:111-51.
45. Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE, Goy RW. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 1980; 31: 147-57.
46. May PC, Kohama SG, Finch CE. N-methyl-aspartic acid lesions of the arcuate nucleus in adult C57BL/6J Mice a new model for agerelated lengthening of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 1989; 50: 605-12.
47. Zama AM, Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrinedisrupting chemicals on female reproduction an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 420-39.
48. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 461-71.
49. Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1034-39.
50. Saldanha CJ, Duncan KA, Walters BJ. Neuroprotective actions of brain aromatase. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30:106-18.
51. Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003; 144: 3329-37.
52. Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 1992; 194:177-92.
53. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing Rat ovary. *Dev Dyn* 2001; 221:443-53.
54. Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K, Ikeda MA. Exposure of neonatal Rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *J Med Dent Sci* 2003; 50: 35-40.
55. Rai M, Jogee PS, Ingle AP. Emerging nanotechnology for detection of mycotoxins in food and feed. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66:363-70.
56. Sherif SO, Salama EE, Abdelwahhab MA. Mycotoxins and child health the need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 347-68.
57. Parandin R, Behnam Rassouli R, Sisakhtnezhad S, Mahdavishahri S. In vitro evaluation of the effects of Zearalenone and α -Zearalenol on MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines of human breast cancer. *Razavi Int J Med* 2015; 3:13-7.
58. Zhao F, Li R, Xiao S, Diao H, El Zowalaty AE, Ye X. Multigenerational exposure to dietary Zearalenone an estrogenic mycotoxin, affects puberty and reproduction in female Mice. *Reprod Toxicol* 2014; 47: 81-8.

Evaluation of Neonatal Exposure to Mycoestrogens Zearalenone and Alpha-zearalenol on Puberty and Reproductive Function in Female Mice

Parandin R¹, Behnamrassouli M^{1*}, Mahdavishahri N¹

(Received: November 21, 2015

Accepted: January 18, 2016)

Abstract

Introduction: It is well known that exposure to estrogenic compounds during critical and sensitive periods of lifespan could result in adverse effects on the development and function of reproductive system. In the present study, we examined the effects of neonatal mycoestrogens Zearalenone (Zen) and alpha-zearalenol (α -Zol) exposure on the onset of puberty and reproductive parameters such as estrous cycle and ovarian follicle pool in female mice.

Materials & methods: Pups were injected subcutaneously at postnatal days (PND) 1-5 with sesame oil, estradiol benzoate (EB, 20 μ g/kg bw), Zen (0.2, 1, 2mg/kg bw) and alpha-Zol(0.2, 1, 2mg/kg bw). The control group received no treatment. Vaginal opening and estrous cycle were monitored from PND 23 to 70. Animals

were sacrificed at PND 70, and blood and ovary were collected.

Finding: Advanced vaginal opening, disrupted estrous cycles and decreased follicular pool were significantly observed in EB, 1 and 2 Zen and 1 and 2 α -Zol. Also, LH and estradiol levels impaired.

Discussion & conclusions: Neonatal exposure to mycoestrogens accelerated the onset of puberty but decreased reproductive parameters in female mice. These alterations could result from disruption anywhere within the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in particular estrogen-sensitive neuronal populations of hypothalamus.

Keywords: Zearalenone, Reproductive functions, Puberty, Female mice

1. Dept of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

*Corresponding author Email: behnam@um.ac.ir