

اثرات تیمار نوزادی متیلپارابن بر آغاز بلوغ، چرخه فحلی و تکامل فولیکول‌های تخمدان موش‌های سورینزاد cBalb

لیلی محمدی^۱، رحمت‌الله پرندین^{*۱}، پویا پورنقی^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: متیلپارابن (MP) از جمله آلاینده‌های گزناستروژن است که بهدلیل خواص آنتی باکتریایی در گروه مواد نگهدارنده طبقه‌بندی می‌شود. هدف از مطالعه حاضر تیمار نوزادی موش‌های ماده با MP و بررسی اثرات آن بر بلوغ، چرخه فحلی و فولیکول‌های تخمدان می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های یکروزه با نژاد cBalb به‌طور تصادفی به ۵ گروه (n=8) شامل کنترل، و سه گروه MP با دوزهای ۰، ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. تزریق به‌روز زیرجلدی طی ۵ روز اول پس از تولد و هر روز یک‌نوبت انجام شد. روز بازشدن واژن به عنوان نشانه آغاز بلوغ و چرخه فحلی به مدت یک‌ماه بررسی شد. موش‌ها در ۷۰ روزگی کشته شده، سرم و تخمدان جهت مطالعات هورمونی و شمارش فولیکول‌ها گردآوری شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS Inc., Chicago, IL; SPSS Inc., Chicago, IL;

verion 18 انجام گرفت و جهت مقایسه گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

نتایج: روز آغاز بلوغ در گروه‌های ۴ (p<0.001) و ۲۰ MP (p<0.005) سریع‌تر به‌وقوع پیوست. میانگین مدت زمان چرخه‌فحلی در گروه‌های ۴ (p<0.05) و ۲۰ MP (p<0.01) افزایش و تعداد چرخه فحلی و شاخص دی‌استروس در گروه‌های ۴ (p<0.01) و ۲۰ MP (p<0.001) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. کاهش تعداد فولیکول‌ها و جسم زرد در گروه‌های ۴ و ۲۰ MP مشاهده شد. غلظت استرادیول در گروه‌های ۴ (p<0.005) و ۲۰ MP (p<0.001) افزایش و غلظت LH (luteinizing hormone) در گروه‌های ۴ و ۲۰ MP مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (p<0.001).

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد مواجهه MP در دوره نوزادی می‌تواند موجب بلوغ زودرس، اختلال در چرخه‌فحلی، کاهش فولیکول‌ها و جسم زرد و اختلال در تراوش هورمون‌های جنسی موش‌ها گردد.

واژه‌های کلیدی: بلوغ، تخمدان، چرخه فحلی، موش.

ارجاع: محمدی لیلی، پرندین رحمت‌الله، پورنقی پویا. اثرات تیمار نوزادی متیلپارابن بر آغاز بلوغ، چرخه فحلی و تکامل فولیکول‌های تخمدان

موش‌های سوری نژاد cBalb. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی بزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۵): ۶۷-۶۵۵.

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۰۳۱۷۸۶۷۱۹، پست الکترونیکی: rahmatparandin@pnu.ac.ir، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷

در هر دو مرحله پیش و پس از تولد حائز اهمیت هستند. بسیاری از این وقایع تمایزی، وابسته به وجود محیطی با حداقل استروژن‌ها هستند و به این دلیل حضور نابهای استروژن‌ها در این محیط‌ها می‌توانند اثرات سوئی را بر سلامتی تولیدمثلى بر جای بگذارند (۱،۴،۵).

پارابن‌ها از جمله EDCs استروژنیک هستند که به دلیل خواص آنتی‌باکتریایی و جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در گروه مواد نگهدارنده طبقه‌بندی می‌شوند. مهم‌ترین و پرکاربردترین پارابن‌ها شامل متیل‌پارابن، اتیل‌پارابن، پروپیل‌پارابن، بنزیل‌پارابن و بوتیل‌پارابن می‌باشند. پارابن‌ها به طور عمده در دوام فروشگاهی محصولات غذایی، دارویی، لوازم آرایشی، ضدآفتاب‌ها و محصولات مراقبت از پوست، همچنین در شامپوها، صابون‌ها و محصولات بوزدا (deodorants) استفاده می‌شوند، اما استفاده مرسوم از پارابن‌ها در لوازم آرایشی و بهداشتی است. به دلیل قیمت ارزان و عملکرد فوق العاده پارابن‌ها در جلوگیری از رشد باکتری‌ها، شرکت‌های بسیاری از این مواد در تولید محصولات خود استفاده می‌کنند. طبق آمار، پارابن‌ها در بیش از ۹۰ درصد محصولات آرایشی و بهداشتی وجود دارند (۶،۷). مطالعات حیوانات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که پارابن‌ها به سرعت از راه دستگاه گوارش و پوست جذب خون شده و مشابه ترکیبات چربی دوست قادر به تجمع در بافت‌های چربی هستند (۸). همین‌طور برخی مطالعات نشان داده‌اند که برخی پارابن‌ها به دلیل فعالیت شبه استروژنی‌شان در بروز سرطان پستان و اختلالات تولیدمثلى از جمله تغییرات هیستولوژیک در رحم، تخدمان و بیضه نقش دارند (۹).

متیل‌پارابن، پارابنی است که به عنوان نگهدارنده استفاده گسترده‌ای در محصولات مصرفی و آرایشی و بهداشتی دارد. مقایسه پارابن‌ها نشان می‌دهد که متیل‌پارابن در بالاترین سطوح در بافت‌ها وجود دارد و به میزان ۶۲ درصد از کل پارابن‌هایی که از بافت‌ها استخراج شده‌است را شامل می‌شود (۸،۱۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که متیل‌پارابن موجود در لوازم آرایشی به میزان زیادی در پوست نفوذ می‌کرده و

مقدمه

ترکیبات محیطی مداخله‌گر اندوکرینی Endocrine disrupting chemicals (EDCs)، دسته‌ای از محصولات طبیعی یا مصنوعی می‌باشند، که توانایی تقلید یا دخالت در فعالیت‌های زیستی هورمون‌های درون‌زاد (endogen) را دارند. در چند سال اخیر تمرکز زیادی بر اثرات زیان‌آور برخی EDCs برانسان‌ها و جوندگان شده است (۱،۲). یک ماده برونزاد (exogen) یا خارجی می‌باشد که در تولید، ترشح، انتقال، متابولیسم، عملکرد یا حذف‌شدن هورمون‌های درون‌زاد دخالت کرده و می‌تواند اعمال فیزیولوژیکی بدن را تحت تاثیر قرار دهد (۳). EDCs شبه‌هورمونی، به مقدار قابل توجهی در تعدادی از محصولات صنعتی از جمله محصولات پلاستیکی، مواد آرایشی و بهداشتی، بطری‌های آب معدنی و سایر نوشیدنی‌ها، ظروف یکبار مصرف، تجهیزات دندان‌پزشکی و همین‌طور در ترکیبات گیاهی از جمله فیتواستروژن‌ها یافت می‌شوند. گزنواستروژن‌ها (Xenoestrogens) به عنوان یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین EDCs، ترکیباتی هستند که از نظر ساختاری و عملکرد، شبیه هورمون استرادیول عمل می‌کنند و به این دلیل با اتصال به گیرنده‌های استروژن موجب اختلال در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای طبیعی سیگناالینگ مرتبط با استروژن‌های درون‌زاد می‌شوند (۱-۳).

در حال حاضر بیشترین نگرانی‌ها در مورد عوارض EDCs متوجه سلامتی تولیدمثلى شده‌است. از جمله این عوارض می‌توان به کاهش اسپرم در نرها و اختلال یا کاهش فولیکول‌های تخدمان، تغییرات چرخه جنسی، تغییرات در سن شروع بلوغ، اختلالات هورمون‌های جنسی، افزایش شیوع سرطان اندام‌های دستگاه تولیدمثل، ناهنجاری‌های جنسیتی و در نهایت نایاروری و کم‌باروری اشاره داشت (۱-۵). دوره نوزادی به علت ادامه تکوین و رشد اندام‌ها و بافت‌های بدن به‌ویژه دستگاه تولیدمثلى در مقایسه با مراحل بعدی زندگی بسیار بیشتر در معرض عوارض مواجهه با EDCs هستند. در واقع مواجهه با این ترکیبات، در ریخت‌زایی و تمایز بافتی اندام‌های حساس در حال رشد و مرتبط با عملکرد تولیدمثلى

هر مادر ۱ تا ۲ فرزند با جنس ماده بهطور تصادفی انتخاب شده و در گروههای ۸ تایی جهت بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی آغاز بلوغ و چرخه فحلی

از روز ۲۴ پس از تولد، موش‌ها جهت بررسی بازشدن واژن Vaginal opening (VO) از راه مشاهده چشمی ایجاد شکاف طولی در واژن بهصورت روزانه مطالعه شدند. در جوندگان آغاز بلوغ جنسی با وقوع VO بهعنوان یک نشانه بیرونی مناسب فعال شدن محور HPG (هیپوتابالموس-هیپوفیز-گناد) تعیین می‌گردد که در حدود ۴ هفته پس از تولد در موش‌های آزمایشگاهی مشاهده می‌شود (۱۳، ۱۴). جهت بررسی چرخه فحلی، اولین استروس در موش‌ها با مشاهده سلول‌های شاخی شده در حدود ۲ تا ۱۰ روز پس از مشاهده بازشدن واژن اتفاق می‌افتد (۱۳). چرخه فحلی بهصورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مشاهده اسمیر واژن تا ۳۰ روز پس از اولین مشاهده سلول‌های شاخی شده بررسی شد. بهطور خلاصه، اسمیرهای واژن از موش‌های ماده با استفاده از سواب آغشته با محلول 0.9NaCl به دست آمد و بر روی لام شیشه‌ای تمیز گسترش تهیه شد و با رنگ متیلن بلو (سیگما) ۱٪ رنگ آمیزی شد و سپس تحت میکروسکوپ نوری (Olympus BX51، ژاپن) مشاهده انجام شد. همین‌طور شاخص دی‌استروس (Diestrus index) بهصورت زیر محاسبه و ثبت شد (۱۳، ۱۴):

$$\frac{\text{تعداد روزهای با اسمیر دی استروس}}{\text{تعداد کل روزهای بررسی اسمیر واژن}} \times 100$$

جمع‌آوری خون، تخدمان و رحم

در حدود روز ۷۰ پس از تولد در مرحله دی‌استروس، ابتدا موش‌ها وزن شده، سپس با کاتامین (آلفاسان، هلند) ۱۰ درصد (۱۰۰ mg/kg) و زایلazin (آلفاسان، هلند) ۲ درصد (۱۰ mg/kg) عمیقاً بی‌هوش شده، در ادامه شکم حیوانات را باز کرده و خون از بطن چپ قلب حیوان با استفاده از سرنگ ۲ cc جمع‌آوری گردید. سپس اندام‌های تولیدمثیل شامل تخدمان‌ها و رحم خارج شده و پس از وزن‌شدن با ترازوی دیجیتال Sartorius

مقاومت بالایی در برابر هیدرولیز بهوسیله پوست انسان و بافت چربی زیرپوستی نشان می‌دهد (۱۱، ۱۰). مطالعات نشان داده که متیل‌پارابن‌به‌دلیل شباهت ساختاری با استروژن می‌تواند اثر استروژن‌های درون‌زاد را به وسیله اتصال با گیرنده‌های استروژن تقلید کند (۱۲-۸).

این که دوره نوزادی، دوران بسیار حساسی است و هنوز محور هیپوتالاموس هیپوفیز-تخدمان (HPG) به‌ویژه نواحی مغزی در حال رشد و تکوین است، لذا در این تحقیق، مواجهه متیل‌پارابن در طی دوره نوزادی و اثرات آن بر زمان آغاز بلوغ، چرخه فحلی، محتوى فولیکولی تخدمان و هورمون‌های جنسی ماده بررسی شد.

روش بررسی

حیوانات، گروه‌بندی و تیمار

در این مطالعه تجربی از تعداد ۲۵ سر موش سوری حامله با نژاد Balb/c خریداری شده از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های پلاستیکی استاندارد در شرایط ۱۲ ساعت روشناختی/۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت 50 ± 5 درصد و دمای 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌های حامله پس از طی دوران بارداری، نوزادان خود را بهصورت طبیعی به‌دبنا آورند. سپس نوزادانه همراه مادر بهطور تصادفی مطابق گروه‌بندی زیر به ۵ گروه شامل کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (روغن ذرت بهعنوان حلal دارو) و سه گروه تجربی دریافت‌کننده متیل‌پارابن با دوزهای 0.8 ، 4 و 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. انتخاب دوزها بر اساس مطالعه قبلی‌یعنی بررسی فعالیت استروژنی متیل‌پارابن در دوزهای نزدیک به مصارف روزانه بود، انجام شد (۱۲). تزریق‌ها به روش زیرجلدی با استفاده از سرنگ انسولین به ناحیه پشت گردن نوزادان طی ۵ روز اول پس از تولد و هر روز یک مرتبه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح انجام گرفت (۱۳). همه موش‌ها جهت بررسی سلامتی و دقت دوز دارو، روزانه قبل از تزریق دارو وزن شدند. زاده‌ها در روز ۲۱ پس از تولد از مادر جدا شده، سپس از

سنجهش هورمون‌ها

پس از لخته‌شدن خون و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور، سرم خون جدا شده و در دمای ۷۰- تا زمان سنجش هورمونی نگهداری شد. اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های استرادیول و لوئینی (LH) با روش سنجش ایمنی رادیواکتیو (R.I.A) مطابق با پروتکل کیت‌های (پیشتاز طب ایران) مربوطه انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار SPSS Inc., Chicago, IL; version 18 جهت تحلیل داده‌ها استفاده شد. نرم‌البرنامه بودن داده‌ها با کمک آزمون کولموجروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) انجام شد. داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA one-way) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey test) استنتاج شدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه‌پیام نور تایید شده است (کد اخلاقی: IR.PNU.REC.1397.081). کلیه مراحل انجام پروپوزال طرح مطابق با آیین‌نامه اخلاق زیستی دانشگاه پیام‌نور انجام گرفت.

نتایج

نتایج بررسی سن آغاز بلوغ جنسی

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، میانگین روز VO به طور معناداری در گروه‌های ۴ و ۲۰ متریل پارابن ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل زودتر مشاهده گردید. یعنی در این گروه‌ها، بلوغ زودرس در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در گروه ۰/۸ متریل پارابن تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید.

نتایج بررسی چرخه فحلی

بررسی ۳۰ روزه چرخه‌فحلی در موش‌ها نشان داد که میانگین طول مدت چرخه‌فحلیدر گروه‌های ۴ و ۲۰ متریل پارابن ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را داشته‌اند. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که تعداد

آلمان) با دقت ۰/۰۰۱ گرم، جهت شمارش فولیکول‌ها، تخدمان‌ها برای مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند (۱۳).

شمارش فولیکول‌های تخدمان

جهت تعیین تعداد انواع فولیکول‌ها در تخدمان، ابتدا تخدمان‌ها با کمک دستگاه پاساز بافتی (Leica، آلمان) با استفاده از الکل با درجات صعودی آبگیری شده، سپس با استفاده از پارافین (مرک، آلمان) قالب‌گیری و در ادامه توسط میکروتوم (Leitz 1512، اتریش) برش‌هایی سریالی با ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. برش‌ها سپس با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و اوزین (Merck، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند و در پایان لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus Bx51 (Olympus، ژاپن) با بزرگنمایی‌های مختلف و با کمک دوربین (OlympusDP71) مشاهده شدند.

دهمین و بیستمین برش‌های سریالی در کل تخدمان به ترتیب جهت شمارش فولیکول‌های کوچک‌تر (فولیکول‌های نخستین، اولیه و ثانویه) و بزرگ‌تر (فولیکول‌های آنترال، آترزی، فولیکول‌گراف و اجسام زرد) به کار رفتند. فولیکول‌های نخستین با داشتن یک اوسویت احاطه‌شده توسط یک لایه از سلول‌های گرانولوزای شاخی‌شده مشخص می‌شوند. فولیکول‌های اولیه دارای یک اوسویت می‌باشند که توسط لایه‌ای از سلول‌های گرانولوزای مکعبی‌شکل احاطه‌شده‌اند. فولیکول‌های ثانویه توسط بیش از یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی احاطه‌شده‌اند که در لایای این سلول‌ها فضای آنتروم مشاهده نمی‌شود. فولیکول‌های آنتروم دارای فضای آنتروم و لایه سلول‌های گرانولوزای متراکم هستند. اجسام زرد که فقط پس از تخمک‌گذاری تشکیل می‌شوند و حاوی سلول‌های لوئینی می‌باشند. فولیکول‌های آترزی دارای ساختارهای غیرطبیعی می‌باشند. فولیکول‌های متراکم، تخمک تحلیل‌رفته، لایه‌های سلولی گرانولوزای ضخیم یا پرشده با مواد غیربرینی در آنتروم هستند (۱۳-۱۶). در مطالعه هیستوتومتریک تخدمان‌ها، فولیکول‌ها به صورت مارپیچی از قشر تخدمان به مرکز و در جهت عقربه‌های ساعت شمارش شدند.

معنادار با گروه کنترل نداشت، ولی این مقدار در گروههای ۴ و ۲۰ متیلپارابن به ترتیب $47\pm 8\%$ ($p<0.01$) و $56\pm 25\%$ ($p<0.01$) بود که در مقایسه با کنترل افزایش معنادار را نشان دادند (جدول ۱).

چرخه‌های فحلی در این مدت در گروههای ۴ ($p<0.01$) و ۲۰ متیلپارابن ($p<0.01$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را داشته‌اند. نتایج همین بخش نشان داد درحالی که شاخص دیاسترس در موش‌های گروه کنترل 37 ± 92 این مقدار در گروه ۸/۰ متیلپارابن 39 ± 17 بود که اختلاف

جدول ۱: تأثیر تجویز متیلپارابن در دوره نوزادی بر سن آغاز بلوغ و چرخه فحلی.

گروهها	(روز پس از تولد)	میانگین مدت زمان چرخه فحلی (روز)	تعداد چرخه فحلی	شاخص دیاسترس٪
کنترل	$34\pm 75\pm 1/67$	$4/87\pm 0/64$	$6/12\pm 0/64$	$37/92\pm 3/05$
شاهد	$35\pm 25\pm 0/87$	$4/50\pm 0/53$	$6/37\pm 0/74$	$37/50\pm 2/36$
۰/۸ متیلپارابن	$34\pm 87\pm 1/46$	$4/75\pm 0/89$	$6/25\pm 0/89$	$39/17\pm 3/45$
۴ متیلپارابن	$32\pm 12\pm 1/64*$	$6/62\pm 1/06*$	$4/50\pm 0/92**$	$47/05\pm 4/52**$
۲۰ متیلپارابن	$30\pm 37\pm 1/68***$	$9/12\pm 1/64***$	$2/87\pm 0/64***$	$56/25\pm 8/05***$

* و ** و *** به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار ($p<0.05$), ($p<0.01$) و ($p<0.001$) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین تحریف معیار نشان داده‌اند.

تخدمان بین گروه ۸/۰ متیلپارابن با گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد. در مقایسه میانگین وزن تخدمان بین گروههای ۴ و ۲۰ متیلپارابن با گروه کنترل کاهش معنادار ($p<0.001$) مشاهده شد. میانگین وزن رحم در ۷۰ روزگی پس از تولد مورد مطالعه قرار گرفت. از مقایسه میانگین وزن رحم بین گروه ۸/۰ متیلپارابن با گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نشد. اما از مقایسه گروههای ۴ و ۲۰ متیلپارابن با گروه کنترل افزایش معنادار مشاهده شد ($p<0.001$).

نتایج بررسی وزن بدنو اندام‌های جنسی

نتایج این بخش در جدول ۲ نشان داده شده‌است. میانگین وزن بدن نوزادان در ۷۰ روزگی پس از تولد بین گروههای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. در گروه ۰/۸ متیلپارابن نسبت به گروه کنترل، میانگین وزن بدن تغییر معناداری را نشان نداد. در مقایسه میانگین وزن بدن بین گروههای ۴ و ۲۰ متیلپارابنبا گروه کنترل کاهش معنادار ($p<0.001$) مشاهده شد. میانگین وزن تخدمان نوزادان مورد مطالعه در ۷۰ روزگی پس از تولد مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه میانگین وزن

جدول ۲: تأثیر تجویز متیلپارابن در دوره نوزادی بر وزن بدن و اندام‌های جنسی در موش‌های ۷۰ روزه.

گروهها	وزن بدن (گرم)	وزن تخدمان (میلی‌گرم)	وزن رحم (میلی‌گرم)
کنترل	$30\pm 37\pm 1/17$	$12/76\pm 0/47$	$59/55\pm 4/44$
شاهد	$29\pm 92\pm 0/99$	$11/97\pm 0/90$	$59/33\pm 3/49$
۰/۸ متیلپارابن	$29/11\pm 1/37$	$12/55\pm 0/49$	$62/16\pm 2/97$
۴ متیلپارابن	$27/31\pm 1/40***$	$10/45\pm 1/28***$	$70/25\pm 5/15** *$
۲۰ متیلپارابن	$25/62\pm 1/18***$	$8/65\pm 0/96***$	$79/95\pm 4/25***$

*** نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار ($p<0.001$) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین تحریف معیار نشان داده‌اند.

آترتیک در گروه ۰/۸ مตیل پارابن در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های گراف بین گروه های ۴ (۰/۰۱) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. کاهش شمارش فولیکول های گراف در گروه ۰/۸ متیل پارابن در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود. در مقایسه میانگین تعداد جسم زرد بین گروه های ۴ (۰/۰۱) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد (شکل ۱). کاهش شمارش جسم زرد در گروه ۰/۸ متیل پارابن در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود.

نتایج هورمونی

همان طور در نمودار ۱ مشاهده می شود، غلظت استرادیول در گروه های ۴ (۰/۰۵) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) به طور معناداری در مقایسه با گروه های کنترل افزایش یافت و غلظت هورمون LH به طور معناداری در گروه های ۴ (۰/۰۰۱) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت.

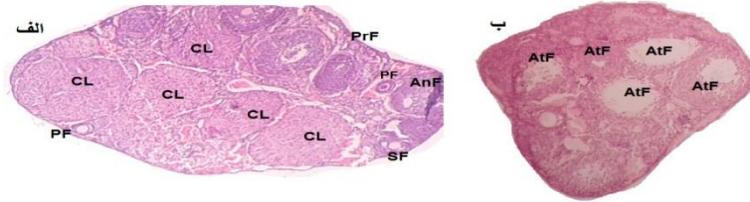
نتایج بررسی شمارش فولیکول های تخمنان

نتایج حاصل از شمارش فولیکول های مختلف تخمنان در ۷۰ روزگی پس از تولد در جدول ۳ نشان داده شده اند. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های نخستین بین گروه های ۴ (۰/۰۱) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های اولیه بین گروه ۲۰ متیل پارابن با گروه کنترل کاهش معنادار (۰/۰۰۱) مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های ثانویه بین گروه های ۰/۸ (۰/۰۰۵) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های آنترال بین گروه های ۴ (۰/۰۵) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۵) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول های آترتیک بین گروه های ۴ (۰/۰۰۱) و ۲۰ متیل پارابن (۰/۰۰۱) با گروه کنترل افزایش معنادار مشاهده شد (شکل ۱). افزایش شمارش فولیکول های

جدول ۳: تاثیر تجویز متیل پارابن در دوره نوزادی بر تعداد فولیکول ها و جسم زرد تخمنان در موش های ۷۰ روزه.

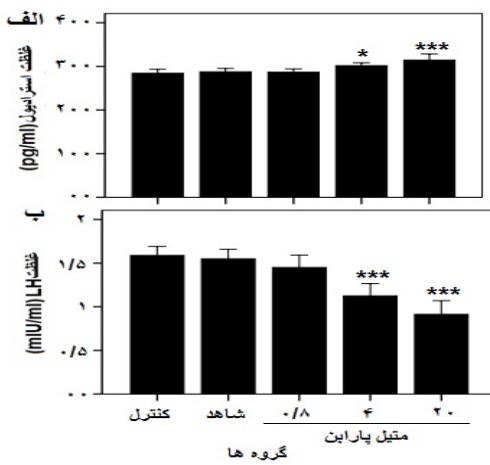
گروه ها	فولیکول نخستین	فولیکول اولیه	فولیکول ثانویه	فولیکول آنترال	فولیکول آترتیک	فولیکول گراف	جسم زرد
کنترل	۸/۸۷±۱۱/۱۰	۱۲±۴/۶۷	/۸۷±۴/۲۲	/۲۵±۳/۲۴	۴۱	۶۵	۳۸/۲۵±۴/۱۰
شاهد	۲۰/۴۲۵±۹/۶۲	۱۶۲±۳/۸۱	/۲۵±۴/۰۶	/۸۷±۳/۴۰	۳۸	۶۵	۳۸/۷۵±۴/۱۳
۰/۸ متیل پارابن	۱۹۵/۷۵±۹/۵۰	۱۸۷±۶/۵۸	/۳۷±۵/۱۰	/۱۲±۴/۰۵	۴۰	۵۷*	۳۵/۶۲±۳/۷۰
۴ متیل پارابن	۱۷۶**	۱۵۰±۷/۵۸	/۷۵±۵/۹۵	/۱۲±۳/۴۰	۳۵*	۵۷*	۲۶/۱۲±۴/۵۲
۲۰ متیل پارابن	۱۵۸***	۱۶۲±۸/۱۹	/۱۲±۴/۶۱	/۶۲±۴/۰۳	۴۱±۴/۸۸	۱/۶۲±۱/۱۹	۸/۵۰±۱/۶۰

* و ** و *** به ترتیب نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (۰/۰۵)، (۰/۰۱) (p<۰/۰۱) و (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل. داده ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعییبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین ± تحریف معیار نشان داده شده اند.



شکل ۱: تاثیر تجویز متیل پارابن در دوره نوزادی بر فولیکول‌ها و جسم زرد تخدمان در موش‌های ۷۰ روزه.

الف) کنترل ب) ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متیل پارابن، CL (فولیکول نخستین)، PF (فولیکول اولیه)، SF (فولیکول آنترا)، AtF (اترتیک یا تحلیل‌رفته). در نمونه کنترل تعداد زیادی جسم زرد و فولیکول‌های مختلف به چشم می‌خورد، در حالی که در نمونه با ترتیق نوزادی متیل پارابن، تعداد زیادی فولیکول اترتیک و کاهش سایر فولیکول‌ها مشاهده می‌گردد.



نمودار ۱: تاثیر تجویز متیل پارابن در دوره نوزادی بر سطوح (الف) استرادیول و (ب) LH در موش‌های ۷۰ روزه.

* و *** به ترتیب نشان دهنده وجود اختلاف معنادار ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین ± احراز معیار نشان داده شده‌اند.

استرادیول بنزووات (۱۷) و فیتواستروژن جنیستین (۱۷) که همگی موجب تسريع در روز VO و بلوغ زودرس در جوندگان آزمایشگاهی شده‌اند، مطابقت دارد. در یافته‌های مختلف حاصل از مطالعات متعدد در جوندگان آزمایشگاهی نشان داده شده که مواجهه نوزادان با استروژن‌ها و ترکیبات محیطی شبکه‌های عصبی و مغزی حساس به تغییرات استروژن‌ها در زمان‌بندی سن آغاز بلوغ اثر گذاشته و منجر به تسريع در بازشدن واژن و درنتیجه بلوغ زودرس گردد، (۱، ۴، ۵، ۱۳، ۱۷). دوره نوزادی یک دوره حساس و بحرانی برای هورمون استروژن در جوندگان می‌باشد. غلظت استروژن در این دوره در کمترین مقدار خود در طول زندگی جوندگان می‌باشد که برای تکوین و

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر حکایت از آن دارد که مواجهه نوزادان موش‌های سوری ماده با متیل پارابن در دوزهای ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن منجر به تغییرات در شاخص‌های مختلف تولید مثلی از جمله بلوغ زودرس، اختلال در چرخه‌فحلي، افزایش وزن رحم، کاهش وزن تخدمان و کاهش سطح هورمون LH و افزایش استرادیول خون می‌شود. در مطالعه حاضر، روز VO در موش‌های تیمارشده با متیل پارابن با دوزهای ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سریع تر به‌وقوع پیوست، که نشانه بلوغ زودرس در این موش‌ها می‌باشد. این یافته‌ها، با یافته‌های قبلی حاصل از مواجهه نوزادی ترکیبات محیطی شبکه‌استروژنیک از جمله تاموکسیفن (۱۳)،

(۲۴،۲۳). در نتیجه احتمال دارد که مواجهه متیلپارابن در چند روز اول پس از تولد با تاثیر بر نورون‌های حساس به استروژن در هسته‌های مغزی بالادست موجب اختلال در چرخه‌فحلی گردد. تنظیم سن بلوغ و چرخه‌فحلی توسط آبشاری از وقایع نورواندوکرینی کنترل می‌شود که بهویژه در تنظیم تراوش از هیپوتالاموس (gonadotropin-releasing hormone) GnRH به عنوان خروجی نهایی مغز در فعال‌سازی محور HPG نقش اساسی دارند. تنظیم دقیق تراوش GnRH و بهدلیل آن تنظیم تراوش گنادوتروپین‌ها بهویژه هورمون LH موجب تنظیم وقایع اصلی محور تولیدمثیل از جمله تنظیم سن آغاز بلوغ، چرخه فحلی، فولیکول‌زایی، تخمک‌گذاری و تولید جسم زرد در تحمانان می‌باشد. اغلب مطالعات بر ترشح LH از هیپوفیز به عنوان نشانگر اصلی تراوش GnRH اشاره دارند چراکه تراوش LH بخوبی با تراوش GnRH هماهنگ می‌باشد و این برخلاف FSH (follicle-stimulating hormone) می‌باشد که تراوش آن بیشتر تحت اثر برخی فاکتورهای گنادی از جمله اینهیبین در سطح هیپوفیز می‌باشد (۲۵). کاهش سطح LH در مطالعه حاضر مشاهده شد که می‌تواند موید ایجاد اختلال نورواندوکرینی در مطالعه حاضر باشد. مواجهه نوزادی با متیلپارابن در مطالعه حاضر با دوزهای بالاتر موجب کاهش وزن تحمانان و افزایش وزن رحم موش‌ها شد. احتمالاً کاهش وزن تحمانان به دلیل کاهش هورمون LH کاهش خزانه فولیکولی و جسم زرد باشد که در این مطالعه مشاهده شده است. افزایش وزن و متابولیسم رحم به وسیله هورمون‌های مترشحه از تحمانان بهویژه استرادیول تنظیم می‌شود (۲۷،۲۶). برخی تحقیقات اظهار داشته‌اند که مواجهه نوزادان یا جنین‌ها با EDCs استروژنیک موجب تغییر میزان گنادوتروپ‌ها و استرادیول می‌گردد (۲۲،۱۴،۱۳). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که گیرنده‌های استروژنی نوع آلفا و بتا هر دو در تحمانان و رحم بیان می‌شوند، امادر رحم سطوح گیرنده‌های آلفا به میزان بیشتری و در تحمانان سطوح گیرنده‌های نوع بتا به میزان بیشتری مشاهده شده است (۲۸-۳۰). تفاوت در وزن مشاهده شده رحم و تحمانان می‌تواند ناشی از تفاوت در بیان گیرنده‌های استروژنی در این اندامها باشد. در مطالعه حاضر، تفاوت در نتایج حاصل از

رشد صحیح مدارهای عصبی کنترل‌کننده سن آغاز بلوغ حیاتی می‌باشد. نورون‌های این نواحی گیرنده استروژن را بیان می‌کنند (۱۸). در مطالعه قبلی (۱۹) گاو از متیلپارابن با دوز بالا (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در مرحله قبل از بلوغ به رتها منجر به تاخیر در سن باز شدن واژن و آغاز بلوغ شد که با مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد. دلیل این تناقض می‌تواند مربوط به اختلاف زیاد دوز مورد استفاده، زمان و روش تزریق دارو و حتی گونه موش مورد استفاده باشد که در دو مطالعه با یکدیگر اختلاف دارند و روشن شدن آن نیاز به مطالعات بعدی دارد. در برخی مطالعات پشنهداد شده که بلوغ زوردرس می‌تواند ناشی از افزایش وزن بدن باشد که با توجه به نتایج در موش‌های این تحقیق که با کاهش وزن بدن همراه بود هم‌خوانی نداشت. برخی مطالعات بر اثرات آنورکتیک (بی‌اشتهاکننده) و کاهش وزن توسط استروژن و ترکیبات شباهستروژنی تاکید دارند (۲۱،۲۰)، که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

تزریق نوزادی متیلپارابن با افزایش مدت زمان چرخه، کاهش تعداد چرخه‌ها و افزایش شاخص دی‌استروسوس موجب ایجاد اختلال در چرخه فحلی موش‌ها گردید. در تحقیقات قبلی بهدلیل مواجهه نوزادی با ترکیبات شباهستروژنی زیرالنون (۲۲) یا تاموکسیفن (۱۳) نتایج مشابهی گزارش شده است. در آن تحقیقات نشان داده شده است مواجهه این ترکیبات استروژنیک منجر به کاهش بیان نوروپیتید کیس‌پپتین (kisspeptin) در هسته‌های کنترل‌کننده چرخه anteroventral periventricular nucleus (AVPV) و (ARC) (4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-(4-propyl)trisphenol (PPT) آگونیست رسپتور آلفای استروژن) و همین‌طور مواجهه با EDC‌های شباهستروژنی مثل جنیستین و بیس‌فنول‌آ نشان داده‌اند که منجر به کاهش تعداد نورون‌های حساس به استروژن مثل کیس‌پپتین در هیپوتالاموس شده و منجر به اختلال در چرخه فحلی در این حیوانات شده است.

دوره نوزادی بر هر جایی از محور HPG از جمله مغز و تخدمان باشد. لذا مواجهه کمتر با متیل پارابن از طریق استفاده از محصولات عاری از ترکیبات پارابن بهویژه در دوره‌های حساس زندگی از جمله نوزادی و کودکی در پیشگیری از وقوع چنین عوارضی توصیه می‌گردد.

سپاس‌گزاری

این تحقیق حاصل از پایان‌نامه خانم لیلی محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی علوم جانوری گرایش سلولی تکوینی می‌باشد و با حمایت مالی دانشگاه پیام‌نور کرمانشاه انجام شده است.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

بررسی‌های مختلف بین دوز کمتر یعنی $0/8$ میلی‌گرم بر کیلوگرم با دوزهای بالاتر یعنی 4 و بیویژه دوز 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید، طوری‌که دوز پایین‌تر، اثر قابل‌توجهی بر این ویژگی‌ها نداشت، که می‌تواند مربوط به اختلاف زیاد بین دوزها باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد تجویز نوزادی دوزهای بالای متیل پارابن در موش‌ها می‌تواند منجر به بلوغ زودرس، اختلال در چرخه‌فحلی، کاهش محتوی فولیکول‌های تخدمانی و جسم زرد و اختلال در تراویش هورمون‌های جنسی گردد. این مشاهدات می‌تواند ناشی از اثرات استروژنیک متیل پارابن در

References:

- 1- Tena-Sempere M. *The Kisspeptin System as Putative Target for Endocrine Disruption of Puberty and Reproductive Health*. In: Bourguignon JP, Jegou B.; Kerdelhue B, Toppari J, Christen Y. editors. *Multi-System Endocrine Disruption*. Springer; Berlin Heidelberg: 2011. p. 23-41.
- 2- Martin OV, Voulvoulis N. *Sustainable Risk Management of Emerging Contaminants in Municipal Wastewaters*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 2009; 367(1904): 3895-922.
- 3- Knez J. *Endocrine-Disrupting Chemicals and Male Reproductive Health*. Reprod BioMed Online 2013; 26(5): 440–8.
- 4- Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. *Estrogen-Like Endocrine Disrupting Chemicals Affecting Puberty in Humans – A Review*. Med Sci Monit 2009; 15(6): RA137-45.
- 5- Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. *Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure*. Reproduction 2012; 143(3): 247–60.
- 6- Gonzalez-doncel M, Garcia-maurino JE, San Segundo L, Beltrán EM, Sastre S, Fernández Torija C. *Embryonic Exposure of Medaka (Oryzias Latipes) to Propylparaben: Effects on Early Development and Post-Hatching Growth*. Environ Pollut 2014; 184: 360-9.
- 7- Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. *Evaluation of the Health Aspects of Methyl Paraben: A Review of the Published Literature*. Food Chem Toxicol 2002; 40(10): 1335-73.
- 8- Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours*. J Appl Toxicol 2004; 24(1): 5-13.
- 9- Scialli AR. *Reproductive Effects of the Parabens*. Reprod Toxicol 2011; 32(1): 138-40.

- 10- Lobemeier C, Tschoetschel C, Westie S, Heymann E. *Hydrolysis of Parabenes by Extracts from Differing Layers of Human Skin.* Biol Chem 1996; 377(10): 647–51.
- 11- El Hussein S, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P. *Assessment of Principal Parabens Used in Cosmetics after Their Passage Through Human Epidermis-Dermis Layers (Ex-Vivo Study).* Exp Dermatol 2007; 16(10): 830-6.
- 12- Sun L, Yu T, Guo J, Zhang Z, Hu Y, Xiao X, et al. *The Estrogenicity of Methylparaben and Ethylparaben at Doses Close to the Acceptable Daily Intake in Immature Sprague-Dawley Rats.* Sci Rep 2016; 28(6): 25173.
- 13- Parandin R, Behnam-Rassouli M, Mahdavi Shahri N. *Oestrogenic Action of Neonatal Tamoxifen on the Hypothalamus and Reproductive System in Female Mice.* Reprod Fertil Dev 2016; 29(5): 1012-20.
- 14- Parandin R, Yousofvand N. *In Utero and Lactational Effects of Aqueous *Foeniculum Vulgare* (Fennel) Seed Extract on Puberty Timing, Estrus Cycle And Sexual Behavior in Mice.* J Arak Uni Med Sci 2018; 20(11): 1-12. [Persian]
- 15- 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(8): 998-1002.
- 16- Parandin R, Behnam Rassouli M, Mahdavi Shahri N. *Evaluation of Neonatal Exposure to Mycoestrogens Zearalenone and Alpha-Zearalenol on Puberty and Reproductive Function in Female Mice.* Sjimu 2017; 24(6): 11-22. [Persian]
- 17- Bateman HL, Patisaul HB. *Disrupted Female Reproductive Physiology Following Neonatal Exposure to Phytoestrogens or Estrogen Specific Ligands Is Associated with Decreased GnRH Activation and Kisspeptin Fiber Density in the Hypothalamus.* Neurotoxicology 2008; 29(6): 988-97.
- 18- Gillies GE, McArthur S. *Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines.* Pharmacol Rev 2010; 62(2): 155-98.
- 19- VO TT, Yoo YM, Choi KC, Jeung EB. *Potential Estrogenic Effect(S) of Parabens at the Prepubertal Stage of a Postnatal Female Rat Model.* Reprod Toxicol 2010; 29(3): 306-16.
- 20- Foster PM, McIntyre BS. *Endocrine Active Agents: Implications of Adverse and Non-Adverse Changes.* Toxicol Pathol 2002; 30(1): 59-65.
- 21- Lampert c, Arcego DM, Laureano DP , Diehl LA, De 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.
- 22- Parandin R, Behnam-Rassouli M, Mahdavi-Shahri N. *Effects of Neonatal Exposure to Zearalenone on Puberty Timing, Hypothalamic Nuclei of AVPV and ARC, and Reproductive Functions in Female Mice.* Reprod Sci 2017; 24(9): 1293-1303.
- 23- Beale KE, Kinsey-Jones 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(3): 1091-98.

- 24- Hu MH, Li XF, McCausland B, Li SY, Gresham R, Kinsey-Jones 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(7): 2619-31.

- 25- Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. **Metastin/Kisspeptin and Control of Estrous Cycle in Rats.** Rev Endocr Metab Disord 2007; 8(1): 21-9.

- 26- Ksheerasagar RL, Kaliwal BB. **Effects of Carbosulfan Administration Schedules on Estrous Cycle and Follicular Dynamics in Albino Mice.** Ind Health 2008; 46(3): 210-6.

- 27- Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, Movérand S, Gao H, Vidal O, et al. **Estrogen Receptor**

Specificity for the Effects of Estrogen in

Ovariectomized Mice. J Endocrinol 2002; 174(2): 167-78.

- 28- Sar M, Welsch F. **Differential Expression of Estrogen Receptor-Beta and Estrogen Receptor-Alpha in the Rat Ovary.** Endocrinology 1999; 140(2):963-71.

- 29- Tan J, Paria BC, Dey SK, Das SK. **Differential Uterine Expression of Estrogen and Progesterone Receptors Correlates with Uterine Preparation for Implantation and Decidualization in the Mouse.** Endocrinology 1999; 140(11): 5310-21.

- 30- Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. **Estrogen Receptor-Beta mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins.** Mol Endocrinol 1997; 11(2): 172-82.

Effects of Methyl paraben neonatal treatment on puberty onset, estrus cycle, and development of ovarian follicles in female mice (Balb/c)

Leili Mohammadi¹, Rahmatollah Parandin^{*1}, Pouya Pournaghi¹

Original Article

Introduction: Methyl paraben (MP) is an xenoestrogen pollutant that is classified into preservatives due to its antibacterial properties. The aim of the present study was to investigate the effects of MP in female neonatal mice on puberty timing, estrus cycle, and ovarian follicle profile.

Methods: In this experimental study, one-day-old Balb/c mice were randomly divided into 5 groups ($n = 8$), including the control, vehicle, and three groups with doses of 0.8, 4 and 20 mg/kg of methyl paraben, respectively. Subcutaneous injection was performed in the first 5 days after birth and once a day. The day of vaginal opening was considered as a sign of puberty and estrus cycle for one month. Then, the mice were sacrificed in 70 days; their serum and ovary were collected for studies of hormonal measurement and counting of follicles. Statistical analysis was performed using SPSS Inc., Chicago, IL; Version 18 and one-way analysis of variance was used for comparing the groups.

Results: The day of puberty onset advanced by 4 ($p < 0.05$) and 20MP ($p < 0.001$). Duration mean of estrus cycle in 4 ($p < 0.05$) and 20MP ($p < 0.001$) and diestrus index in 4 ($p < 0.01$) and 20MP ($p < 0.001$) increased compared to the control group. Reduction in the number of ovarian follicles and corpus luteum was observed in 4 and MP20 groups. The concentration of estradiol increased in 4 ($p < 0.05$) and MP20 ($p < 0.001$) groups and the concentration of LH in 4 and MP20 groups was decreased compared to the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: The study showed that exposure to the MP during neonatal period could lead to Precocious puberty, estrus dysfunction, decreased ovarian follicle content and corpus luteum and impaired secretion of sex hormones.

Keywords: Puberty, Ovary, Estrus cycle, Mice.

Citation: Mohammadi L, Parandin R, Pournaghi P. Effects of Methyl paraben neonatal treatment on puberty onset, estrus cycle, and development of ovarian follicles in female mice (Balb/c). J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(5): 1556-67.

¹Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Tel: 09031786719, email: rahmatparandin@pnu.ac.ir