

اثرات تیمار نوزادی متیل پارابن بر آغاز بلوغ، چرخه فحلی و تکامل فولیکول‌های تخمدان موش‌های سورینژاد Balb/c

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

مقاله پژوهشی

مقدمه: متیل‌پارابن (MP) از جمله آلاینده‌های گزنواستروژن است که به دلیل 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 Balb/c به‌طور تصادفی به ۵ گروه (n=۸) شامل کنترل، و سه گروه MP با دوزهای ۰/۸، ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. تزریق به‌روش زیرجلدی طی ۵ روز اول پس از تولد و هر روز یک‌نوبت انجام شد. روز بازشدن واژن به‌عنوان 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; version 18 انجام گرفت و جهت مقایسه گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

نتایج: روز آغاز بلوغ در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰MP (p<۰/۰۰۱) سریع‌تر به‌وقوع پیوست. میانگین مدت زمان چرخه‌فحلی در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰MP (p<۰/۰۰۱) افزایش و تعداد چرخه فحلی و شاخص دی‌استروس در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۰۱) و ۲۰MP (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. کاهش تعداد فولیکول‌ها و جسم زرد در گروه‌های ۴ و ۲۰MP مشاهده شد. غلظت استرادیول در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰MP (p<۰/۰۰۱) افزایش و غلظت LH (luteinizing hormone) در گروه‌های ۴ و ۲۰MP در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (p<۰/۰۰۱).

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 رحمت‌اله، پورنقی پویا. اثرات تیمار نوزادی متیل‌پارابن بر آغاز بلوغ، چرخه فحلی و تکامل فولیکول‌های تخمدان موش‌های سوری نژاد Balb/c. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۵): ۶۷-۱۵۵۶.

۱- گروه زیست‌شناسی، 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 نابه‌جای EDCs استروژنیک در این محیط‌ها می‌تواند اثرات سوئی را بر سلامتی تولیدمثلی برجای بگذاردند (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 به‌طور 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 فوق‌العاده 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 به‌سرعت از راه دستگاه گوارش و پوست جذب خون شده و مشابه ترکیبات چربی‌دوست 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 تولیدمثلی از جمله تغییرات هیستولوژیک در رحم، تخمدان و بیضه نقش دارند (۹).

متیل‌پارابن، پارابنی است که به‌عنوان 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

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 بر انسان‌ها و جوندگان شده است (۱،۲). یک EDC، 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) به‌عنوان 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 سیگنالینگ مرتبط با استروژن‌های درون‌زاد می‌شوند (۱-۳).

در حال حاضر بیشترین نگرانی‌ها در مورد عوارض EDCs متوجه سلامتی تولیدمثلی شده‌است. از جمله این عوارض می‌توان به کاهش اسپرم در نرها و اختلال یا کاهش فولیکول‌های تخمدان، تغییرات چرخه جنسی، تغییرات در سن شروع بلوغ، اختلالات هورمون‌های جنسی، افزایش شیوع سرطان اندام‌های دستگاه تولیدمثل، ناهنجاری‌های جنسیتی و در نهایت ناباروری و کم‌باروری اشاره داشت (۵-۱). دوره نوزادی به‌علت ادامه تکوین و رشد اندام‌ها و بافت‌های بدن به‌ویژه دستگاه تولیدمثل 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 تولیدمثلی

هر مادر ۱ تا ۲ فرزند با جنس ماده به طور 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 باز شدن واژن (VO) Vaginal opening از راه مشاهده چشمی ایجاد شکاف طولی در واژن به صورت روزانه مطالعه شدند. در جوندگان آغاز بلوغ جنسی با وقوع VO به عنوان یک نشانه بیرونی مناسب فعال شدن محور HPG (هیپوتالاموس-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 باز شدن واژن اتفاق می‌افتد (۱۳). چرخه فحلی به صورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مشاهده اسمیر واژن تا ۳۰ روز پس از اولین مشاهده سلول‌های شاخی شده بررسی شد. به طور خلاصه، اسمیرهای واژن از موش‌های ماده با استفاده از سوآپ آغشته با محلول ۰/۹ NaCl 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) به صورت 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، تخمدان و رحم

در حدود روز ۷۰ پس از تولد در مرحله دی‌استروس، ابتدا موش‌ها وزن شده، سپس با کتامین (آلفاسان، هلند) ۱۰ درصد (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (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 تولیدمثلی شامل تخمدان‌ها و رحم خارج شده و پس از وزن شدن با ترازوی دیجیتال (Sartorius،

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

این‌که دوره نوزادی، دوران بسیار حساسی است و هنوز محور هیپوتالاموس هیپوفیز تخمدان (HPG) به‌ویژه نواحی مغزی در حال رشد و تکوین است، لذا در این تحقیق، مواجهه متیل پارابن در طی دوره نوزادی و اثرات آن بر زمان آغاز بلوغ، چرخه فحلی، محتوی فولیکولی تخمدان 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 روشنائی/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 به صورت طبیعی به دنیا آوردند. سپس نوزادان به همراه مادر به طور تصادفی مطابق گروه‌بندی زیر به ۵ گروه شامل کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (روغن ذرت به عنوان حلال دارو) و سه گروه تجربی دریافت‌کننده متیل پارابن با دوزهای ۰/۸، ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. انتخاب دوزها بر اساس مطالعه قبلی یعنی بررسی فعالیت استروژنی متیل پارابن 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

سنجش 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 لوتئینی (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 از نرم افزار تحلیل داده‌ها استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با کمک آزمون کولموگوروف 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 \pm انحراف معیار بیان گردید.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه‌هیام نور تایید شده است (کداخلاق: 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 به‌طور معناداری در گروه‌های ۴ ($p < 0.05$) و ۲۰ متیل‌پارابن ($p < 0.001$) 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 متیل‌پارابن تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید.

نتایج بررسی چرخه فعلی

بررسی ۳۰ روزه چرخه‌فعلی در موش‌ها نشان داد که میانگین طول مدت چرخه‌فعلی در گروه‌های ۴ ($p < 0.05$) و ۲۰ متیل‌پارابن ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را داشته‌اند. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که تعداد

آلمان) با دقت ۰/۰۱ گرم، جهت شمارش فولیکول‌ها، تخمدان‌ها برای مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند (۱۳).

شمارش فولیکول‌های تخمدان

جهت تعیین تعداد انواع فولیکول‌ها در تخمدان، ابتدا تخمدان‌ها با کمک دستگاه پاساژ بافتی (Leica، آلمان) با استفاده از الکل با درجات صعودی آبیگری 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 ائوزین (Merck، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند و در پایان لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus Bx51، ژاپن) با بزرگ‌نمایی‌های مختلف و با کمک دوربین (Olympus DP71) مشاهده شدند.

دهمین و بیستمین برش‌های سریالی در کل تخمدان 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 اووسیت احاطه‌شده توسط یک لایه از سلول‌های گرانولوزای شاخی‌شده مشخص می‌شوند. فولیکول‌های اولیه دارای یک اووسیت می‌باشند که توسط لایه‌ای از سلول‌های گرانولوزای مکعبی‌شکل احاطه‌شده‌اند. فولیکول‌های ثانویه توسط بیش از یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی احاطه‌شده‌اند که در لایه‌ای 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 لوتئینی می‌باشند. فولیکول‌های آترزی دارای ساختارهای غیرطبیعی مثل مایع فولیکولی متراکم، تخمک تحلیل‌رفته، لایه‌های سلولی گرانولوزای ضخیم یا پرشده با مواد فیبرینی در آنتروم هستند (۱۶-۱۳). در مطالعه هیستومتریک تخمدان‌ها، فولیکول‌ها به صورت ماریچی از قشر تخمدان به مرکز و در جهت عقربه‌های ساعت شمارش شدند.

معنادار با گروه کنترل نداشت، ولی این مقدار در گروه‌های ۴ و ۲۰ متیل پارابن به ترتیب ۰/۴۷/۰۸٪ ($p < 0/01$) و ۰/۵۶/۲۵٪ ($p < 0/001$) 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 متیل پارابن ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را داشته‌اند. نتایج همین‌بخش نشان داد درحالی که شاخص دی‌استروس در موش‌های گروه کنترل ۰/۳۷/۹۲٪ بود، این مقدار در گروه ۰/۸ متیل پارابن ۰/۳۹/۱۷٪ بود که اختلاف

جدول ۱: تاثیر تجویز متیل پارابن در دوره نوزادی بر سن آغاز بلوغ و چرخه فحلی.

گروه‌ها	VO (روز پس از تولد)	میانگین مدت زمان چرخه فحلی (روز)	تعداد چرخه فحلی	شاخص دی‌استروس٪
کنترل	۳۴/۷۵±۱/۶۷	۴/۸۷±۰/۶۴	۶/۱۲±۰/۶۴	۳۷/۹۲±۳/۰۵
شاهد	۳۵/۲۵±۰/۸۷	۴/۵۰±۰/۵۳	۶/۳۷±۰/۷۴	۳۷/۵۰±۲/۳۶
۰/۸ متیل پارابن	۳۴/۸۷±۱/۴۶	۴/۷۵±۰/۸۹	۶/۲۵±۰/۸۹	۳۹/۱۷±۳/۴۵
۴ متیل پارابن	۳۲/۱۲±۱/۶۴*	۶/۶۲±۱/۰۶*	۴/۵۰±۰/۹۲**	۴۷/۰۵±۴/۵۲**
۲۰ متیل پارابن	۳۰/۳۷±۱/۶۸***	۹/۱۲±۱/۶۴***	۲/۸۷±۰/۶۴***	۵۶/۲۵±۸/۰۵***

* 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±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

نتایج بررسی وزن بدن و 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 متیل پارابن نسبت به گروه کنترل، میانگین وزن بدن تغییر معناداری را نشان نداد. در مقایسه میانگین وزن بدن بین گروه‌های ۴ و ۲۰ متیل پارابن با گروه کنترل کاهش معنادار ($p < 0/001$) مشاهده شد. میانگین وزن تخمدان نوزادان مورد مطالعه در ۷۰ روزگی پس از تولد مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه میانگین وزن

تخمندان بین گروه ۰/۸ متیل پارابن با گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد. در مقایسه میانگین وزن تخمدان بین گروه‌های ۴ و ۲۰ متیل پارابن 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 ۰/۸ متیل پارابن با گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نشد. اما از مقایسه گروه‌های ۴ و ۲۰ متیل پارابن با گروه کنترل افزایش معنادار مشاهده شد ($p < 0/001$).

جدول ۲: تاثیر تجویز متیل پارابن در دوره نوزادی بر وزن بدن و اندام‌های جنسی در موش‌های ۷۰ روزه.

گروه‌ها	وزن بدن (گرم)	وزن تخمدان (میلی‌گرم)	وزن رحم (میلی‌گرم)
کنترل	۳۰/۳۷±۱/۱۷	۱۲/۷۶±۰/۴۷	۵۹/۵۵±۴/۴۴
شاهد	۲۹/۹۲±۰/۹۹	۱۱/۹۷±۰/۹۰	۵۹/۳۳±۳/۴۹
۰/۸ متیل پارابن	۲۹/۱۱±۱/۳۷	۱۲/۵۵±۰/۴۹	۶۲/۱۶±۲/۹۷
۴ متیل پارابن	۲۷/۳۱±۱/۴۰***	۱۰/۴۵±۱/۲۸***	۷۰/۲۵±۵/۱۵**
۲۰ متیل پارابن	۲۵/۶۲±۱/۱۸***	۸/۶۵±۰/۹۶***	۷۹/۹۵±۴/۲۵***

***نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار ($p < 0/01$) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

نتایج بررسی شمارش فولیکول‌های تخمدان

نتایج حاصل از شمارش فولیکول‌های مختلف تخمدان در ۷۰ روزگی پس از تولد در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های نخستین بین گروه‌های ۴ (p<۰/۰۱) و ۲۰ متیل‌پارابن (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه بین گروه ۲۰ متیل‌پارابن با گروه کنترل کاهش معنادار (p<۰/۰۰۱) مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های ثانویه بین گروه‌های ۰/۸ (p<۰/۰۵)، ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰ متیل‌پارابن (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال بین گروه‌های ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰ متیل‌پارابن (p<۰/۰۵) با گروه کنترل کاهش معنادار مشاهده شد. در مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال بین ۲۰ و ۴ (p<۰/۰۰۱) با گروه کنترل افزایش معنادار مشاهده شد (شکل ۱). افزایش شمارش فولیکول‌های

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

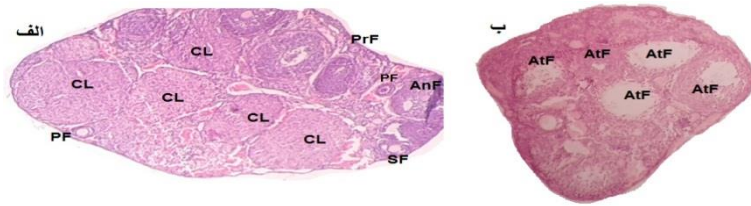
نتایج هورمونی

همان‌طور در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، غلظت استرادیول در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۵) و ۲۰ متیل‌پارابن (p<۰/۰۰۱) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش یافت و غلظت هورمون LH به‌طور معناداری در گروه‌های ۴ (p<۰/۰۰۱) و ۲۰ متیل‌پارابن (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت.

جدول ۳: تاثیر تجویز متیل‌پارابن در دوره نوزادی بر تعداد فولیکول‌ها و جسم زرد تخمدان در موش‌های ۷۰ روزه.

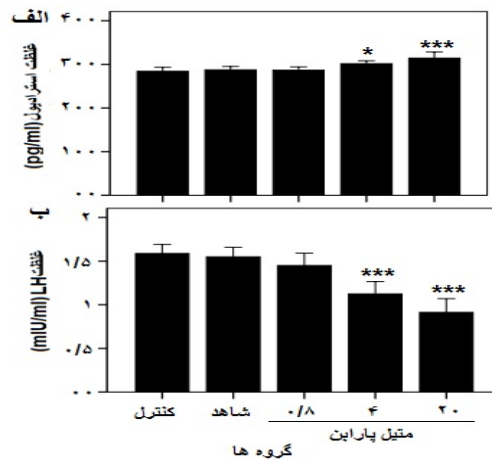
گروه‌ها	فولیکول نخستین	فولیکول اولیه	فولیکول ثانویه	فولیکول آنترال	فولیکول آترتیک	فولیکول گراف	جسم زرد
کنترل	۱۸۷±۱۱/۱۰	۱۲±۴/۶۷	۸۷±۴/۲۲	۲۵±۳/۲۴	۱/۶۲±۱/۱۹	۸/۵۰±۱/۶۰	۳۸/۲۵±۴/۱۰
شاهد	۲۰۴/۲۵±۹/۶۲	۶۲±۳/۸۱	۲۵±۴/۰۶	۸۷±۳/۴۰	۱/۲۵±۱/۰۳	۸/۸۷±۱/۲۵	۳۸/۷۵±۴/۱۳
۰/۸ متیل‌پارابن	۱۹۵/۷۵±۹/۵۰	۸۷±۶/۵۸	۳۷±۵/۱۰	۱۱۲±۴/۰۵	۳/۸۷±۲/۲۳	۶/۸۷±۱/۶۴	۳۵/۶۲±۳/۷۰
۴ متیل‌پارابن	۱۷۵±۱۰/۰۴	۵۰±۷/۵۸	۷۵±۵/۹۵	۱۱۲±۳/۴۰	۱/۲۵±۲/۱۹	۵/۵۰±۱/۵۱	۲۶/۱۲±۴/۵۲
۲۰ متیل‌پارابن	۱۶۲±۱۸/۶۳	۲۵±۸/۱۹	۱۱۲±۴/۶۱	۱۶۲±۴/۰۳	۱/۱۲±۴/۸۸	۴/۱۲±۰/۹۹	۱۸/۸۷±۳/۶۸*

* و ** و *** به ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵)، (p<۰/۰۱) و (p<۰/۰۱) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به‌صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



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

الف) کنترل (ب) ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متیل پارابن، CL (جسم زرد)، PrF (فولیکول نخستین)، PF (فولیکول اولیه)، SF (فولیکول ثانویه)، AnF (فولیکول آنترال) و AtF (آترتیک یا تحلیل‌رفته). در نمونه کنترل تعداد زیادی جسم زرد و فولیکول‌های مختلف به چشم می‌خورد، در حالی که در نمونه با تزریق نوزادی متیل پارابن، تعداد زیادی فولیکول آترتیک 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 ($p < 0.001$) با گروه کنترل. داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استنتاج شده و به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

استرادیول بنزوات (۱۷) و فیتواستروژن جنیستین (۱۷) که همگی موجب تسریع 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 شبه‌استروژنیک می‌تواند با تاثیر بر تکوین و تمایز برخی شبکه‌های عصبی و مغزی حساس به تغییرات استروژن‌ها در زمان بندی سن آغاز بلوغ اثر گذاشته و منجر به تسریع در باز شدن واژن و در نتیجه بلوغ زودرس گردد، (۱۷، ۱۳، ۵، ۴، ۱). 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 چرخه‌فحلی، افزایش وزن رحم، کاهش وزن تخمدان و کاهش سطح هورمون LH و افزایش استرادیول خون می‌شود. در مطالعه حاضر، روز VO در موش‌های تیمار شده با متیل پارابن با دوزهای ۴ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سریع‌تر به وقوع پیوست، که نشانه بلوغ زودرس در این موش‌ها می‌باشد. این یافته‌ها، با یافته‌های قبلی حاصل از مواجهه نوزادی ترکیبات محیطی شبه‌استروژنیک 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 آبخاری از وقایع نورواندوکرینی کنترل می‌شود که به‌ویژه در تنظیم تراوش GnRH (gonadotropin-releasing hormone) از هیپوتالاموس به‌عنوان خروجی نهایی مغز در فعال‌سازی محور HPG نقش اساسی دارند. تنظیم دقیق تراوش GnRH و به‌دنبال آن تنظیم تراوش گنادوتروپین‌ها به‌ویژه هورمون LH موجب تنظیم وقایع اصلی محور تولیدمثلی از جمله تنظیم سن آغاز بلوغ، چرخه فحلی، فولیکول‌زایی، تخمک‌گذاری و تولید جسم زرد در تخمدان می‌باشد. اغلب مطالعات بر ترشح LH از هیپوفیز به‌عنوان 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 تخمدان و افزایش وزن رحم موش‌ها شد. احتمالاً کاهش وزن تخمدان به‌دلیل کاهش هورمون LH، کاهش خزانه فولیکولی و جسم زرد باشد که در این مطالعه مشاهده شده‌است. افزایش وزن و متابولیسم رحم به‌وسیله هورمون‌های مترشحه از تخمدان به‌ویژه استرادیول تنظیم می‌شود (۲۶،۲۷). برخی تحقیقات اظهار داشته‌اند که مواجهه نوزادان یا جنین‌ها با EDCs استروژنیک موجب تغییر میزان گنادوتروپ‌ها و استرادیول می‌گردند (۱۳،۱۴،۲۲). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که گیرنده‌های استروژنی نوع آلفا و بتا هر دو در تخمدان و رحم بیان می‌شوند، امادر رحم سطوح گیرنده‌های آلفا به میزان بیشتری و در تخمدان سطوح گیرنده‌های نوع بتا به میزان بیشتری مشاهده شده‌است (۲۸-۳۰). تفاوت در وزن مشاهده شده رحم و تخمدان 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) گاوآژ 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 پیشنهاد شده که بلوغ زودرس 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 شبه‌استروژنی تاکید دارند (۲۰،۲۱)، که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

تزریق نوزادی متیل‌پارابن با افزایش مدت زمان چرخه، کاهش تعداد چرخه‌ها و افزایش شاخص دی‌استروس موجب ایجاد اختلال در چرخه فحلی موش‌ها گردید. در تحقیقات قبلی به‌دنبال مواجهه نوزادی با ترکیبات شبه‌استروژنی زیرالنون (۲۲) یا تاموکسیفن (۱۳) نتایج مشابهی گزارش شده‌است. در آن تحقیقات نشان داده شده‌است مواجهه این ترکیبات استروژنیک منجر به کاهش بیان نوروپپتید کیس‌پپتین (kisspeptin) در هسته‌های کنترل‌کننده چرخه تولیدمثلی (anteroventral periventricular nucleus) و (AVPV) و (arcuate nucleus (ARC) و در نتیجه اختلال در چرخه فحلی می‌شود. نتایج مطالعات تیمار نوزادی جوندگان با استرادیول و 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5- و triisphenol (PPT) (تری‌اسپنول) (آگونیسست رسپتور آلفای استروژن) و همین‌طور مواجهه با EDC‌های شبه‌استروژنی 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 تخمدان باشد. لذا مواجهه کمتر با متیل پارابن از طریق استفاده از محصولات عاری از ترکیبات پارابن به ویژه در دوره های حساس زندگی از جمله نوزادی و کودکی در پیشگیری از وقوع چنین عوارضی توصیه می گردد.

سپاس گذاری

این تحقیق حاصل از پایان نامه خانم لیلی محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی تکوینی می باشد و با حمایت مالی دانشگاه پیام نور کرمانشاه انجام شده است.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

بررسی های مختلف بین دوز کمتر یعنی ۰/۸ میلی گرم بر کیلوگرم با دوزهای بالاتر یعنی ۴ و بویژه دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید، طوری که دوز پایین تر، اثر قابل توجهی بر این ویژگی ها نداشت، که می تواند مربوط به اختلاف زیاد بین دوزها باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد تجویز نوزادی دوزهای بالای متیل پارابن در موش ها می تواند منجر به بلوغ زودرس، اختلال در چرخه فحلی، کاهش محتوی فولیکول های تخمدانی و جسم زرد و اختلال در تراوش هورمون های جنسی گردد. این مشاهدات می تواند 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 AMath 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*. Sjim 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, Movérare 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