Original Article

The Effect of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Mouse Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Parameters

Zare Z., M.Sc.*, Eimani H., Ph.D., Mohammadi M., Ph.D., Mofid M., M.Sc., Dashtnavard H., Ph.D.

** Department of Anatomy, Sabzevar Medical School, Mashhad., Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study is to evaluate the effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular spermatid number per gram testis (TSN), daily sperm production (DSP), count, motility, viability, morphology, and chromatine quality of epididymal sperm.

Materials and Methods: The protocol for DEHP administration was that adult male NMRI mice (the age group of 4 weeks) received 2g DEHP/100µl corn oil/kg, and vehicle group received 100µl corn oil/kg by gavage for 14 days. The control group did not receive DEHP.

All the samples were assessed according to World Health Organization (WHO) criteria. Sperm morphology was assessed using papanicula staining. Sperm chromatine quality was assessed using aniline-blue staining.

Results: Administration of DEHP induced significantly reduction of TSN, DSP and epididymal sperm count ($p<0.05$). The percentage of motility, viability, normal morphology, and chromosomal quality were significantly low in comparison with control group ($p<0.05$).

Conclusion: These results demonstrated that DEHP administration has toxic effects on TSN, DSP, epididymal sperm parameter and finally on male reproductive system.

Key words: Di-(2-ethylhexyl) phthalate, Daily sperm production, Sperm parameters, Toxic effects

مقاله تحقیقی

اثر دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات بر تولید روزانه اسپرم و پارامترهای اسپرم اپیدیدیم موش سوری

زهره زارع .M.Sc*، حسین ایمانی .Ph.D**، مسلم محمدی .Ph.D***، محمود مفید .M.Sc**، حسین دشت نورد.Ph.D**

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی سبزوار، ایران
** گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
*** گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران
تاریخ وصول: آذرماه ۸۷ ، تاریخ پذیرش: دی‌ماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی آثار ۲دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات (DEHP: Di-(2-ethylhexyl) Phtalate) بر تعداد اسپرماتیدها در هر گرم بافت بیضه (TSN: Testicular spermatid per geram testis)، تولید روزانه اسپرم (DSP: Daily sperm production)، تعداد، تحرک، قابلیت زنده ماندن، مورفولوژی و کیفیت کروماتین اسپرم اپیدیدیم موش سوری نر.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق موش‌های سوری نر بالغ نژاد NMRI با میانگین سنی ٤ هفته انتخاب و سپس به سه گروه کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند. هر موش در گروه تجربی روزانه با ۲g DEHP/۱۰۰ µl corn oil/ kg و در گروه شم روزانه با ۱۰۰ µl corn oil/ kg به مدت ١٤ روز گاواژ شد. موش‌ها در گروه کنترل چیزی دریافت نمی‌کردند. آنالیز اسپرم براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) انجام شد. برای بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها از رنگ آمیزی پاپانیکولا و برای بررسی کیفیت کروماتین از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد.

یافته‌ها: تجویز DEHP موجب کاهش معنی‌دار TSN و DSP و تعداد اسپرم اپیدیدیم شد ($p<0.05$). علاوه بر این DEHP درصد مورفولوژی طبیعی و کیفیت کروماتین اسپرم اپیدیدیم موش سوری را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌دار کاهش داد ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های مطالعه حاضر، DEHP بر TSN، DSP ، پارامترهای اسپرم و در کل سیستم تولیدمثلی جنس مذکر اثر سمی دارد.

کلید واژه‌ها: دی(۲- اتیل هگزیل) فتالات، تولید روزانه اسپرم، پارامترهای اسپرم، آثار سمی

مقدمه

مواجهه روزمره انسان وحیوان با مقادیر زیاد مواد شیمیایی صنعتی و حشره کش‌ها نگرانی فزاینده‌ای برای جامعه علمی و عمومی در دهه گذشته بوده است [۱]. یک گروه از این مواد شیمیایی دی استرهای فتالیک اسید هستند که معمولاً تحت عنوان فتالات‌ها نامیده می‌شوند. در جهان سالانه حدود ۱۸ بیلیون تن فتالات تولید می‌شود. در ابتدا فتالات‌ها به‌عنوان نرم‌کننده در محصولات پلی وینیل کلراید (PVC) استفاده

آدرس مکاتبه: سبزوار، جنب پلیس راهنمایی و رانندگی، دانشکده علوم پزشکی سبزوار
E-mail: Zare1980@gmail.com

می‌شدند، ولی به تدریج استفاده از آنها گستردگی بیشتری یافت. تولیدات ساختمانی و ماشینی، وسایل منزل، بسته بندی‌های غذا، اسباب بازی‌ها [۲]، تجهیزات پزشکی، لباس‌های بارانی، چسب‌ها، عطرها و وسایل آرایشی هر کدام دارای مقادیر متفاوتی از فتالات‌ها هستند [۱].

دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) فتالاتی است که بیشترین کاربرد را در طبیعت دارد [۳]. از آنجایی‌که DEHP از نظر شیمیایی به پلیمر متصل نمی‌شود، حین تولید یا استفاده می تواند از آن جدا شود [٤]. DEHP می‌تواند از طریق هوا، آب، غذا و حتی با استفاده از وسایل پزشکی به انسان منتقل شود [٥] ولی با این حال منبع اصلی آلودگی انسان به DEHP از طریق خوراکی است [٦]. بعد از مواجهه با DEHP ازطریق خوراکی، به‌دلیل حضور استرازها در روده کوچک مقداری از آن به متابولیت‌های مربوط یعنی مونو- (۲- اتیل هگزیل) فتالات(MEHP) و ۲- اتیل هگزانول (EH- ۲) تبدیل می‌شود [۷]. مطالعات نشان داده‌اند که DEHP موجب ایجاد آثار سمی بر بافت کلیه [۸]، قلب، ریه و کبد [۹] می‌شود. به علاوه DEHP می‌تواند آثار منفی بر سیستم تولیدمثلی و تکاملی ایجاد کند [۱۰]. فتالات‌ها به‌ویژه DEHP موجب کاهش احتمال ایجاد بارداری، افزایش سقط‌های خودبه‌خودی و افزایش ناهنجاری‌های مادرزادی و تولیدمثلی می‌شوند [۱۱].

شافر (Shafer) و همکاران در سال ۱۹٤٥ گزارش کردند که DEHP از طریق کاهش میزان Zinc در بیضه، تغییر میزان تستوسترون و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها باعث آسیب به بافت بیضه می‌شود [۱۲]. بروز این صدمات در بافت بیضه توسط پارک (Park) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز تأیید شد [۱۳]. پارمار (Parmar) و همکاران (۱۹۸٦) بیان کردند که DEHP فعالیت آنزیم‌های دخیل در بلوغ اسپرم را تغییر می‌دهد [۱٤]. در تحقیق دیگری مشخص شد سمیت تولیدمثلی DEHP در موش صحرایی و موش سوری با کاهش وزن بیضه و تخمدان، کاهش توانایی لقاح و اندازه جنین همراه است [۱۰].

آکینگبمی (Akingbemi) در سال ۲۰۰۱ با تحقیق روی فرزندان نر موش‌های ماده که در دوران بارداری با DEHP تیمار شده بودند، از کاهش میزان تستوسترون و LH خون به دنبال تیمار با DEHP خبر داد [۱٥]. دیوید (David) و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان کردند که تجویز خوراکی DEHP موجب اختلال در روند اسپرماتوژنزیس می‌شود [۸]. در مطالعه‌ای که توسط آندریانا (Andriana) وهمکاران (۲۰۰٤) انجام شد مشخص شد مواجهه با MEHP (متابولیت اصلی DEHP) در غلظت‌های پایین موجب آپوپتوز سلول‌های سرتولی و سلول‌های رده اسپرماتوژنیک و در غلظت‌های بالاتر موجب نکروز این سلول‌ها می‌شود [۱٦]. در سال ۲۰۰٤ آبلاک (Ablake) و همکاران اختلال در روند اسپرماتوژنزیس را در حیوانات آزمایشگاهی مواجه شده با DEHP مشاهده کردند [۱۷].

براساس اطلاعات موجود تاکنون مطالعه‌ای به منظور بررسی آثار DEHP بر قابلیت زنده ماندن و کیفیت کروماتین اسپرم صورت نگرفته است. بنابراین با انجام این مطالعه علاوه بر بررسی آثار DEHP بر این پارامترها، اثر آن بر تعداد اسپرماتیدها در هر گرم بافت بیضه (TSN)، تولید روزانه اسپرم (DSP)، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم اپیدیدیم موش سوری به‌طور همزمان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق موش‌های سوری نر نژاد NMRI با میانگین سنی ٤ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲٥- ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. حیوانات به‌طور تصادفی به گروه‌های کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰ سر موش سوری قرار گرفت. حیوانات گروه کنترل هیچ ماده‌ای دریافت نمی‌کردند و در گروه شم حیوانات به مدت دو هفته با ۱۰۰ میکرولیتر روغن ذرت گاواژ می‌شدند. در گروه تجربی حیوانات روزانه

و بـه مـدت دو هفتـه بـا ۲g DEHP/۱۰۰ µl corn oil/ kg (CASNO: 117-81-7, Osaka, Japan) گاواژ می‌شدند.

در شرایط استریل با ایجاد شکافی در قسمت تحتانی شـکم موش‌ها، اپیدیدیم و بیضه راست خارج شدند. دم اپیدیدیم بـا یک قیچی استریل قطعه قطعه شده و داخل ۱ میلی‌لیتر محـیط کشت T_6 حاوی ٤ mg/ml BSA که از قبل آماده و به‌مـدت ۲ سـاعت انکوبـه شـده بـود قـرار داده شـد. بـه‌منظـور ایجـاد ظرفیت‌یـابی لازم در اسـپرم محـیط بـه‌مـدت یـک‌سـاعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد نگهداری شد. بیضه راست تا شروع کار برای بـه‌دسـت آوردن میـزان تولیـد روزانه اسپرم (DSP) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گـراد منجمـد باقی ماند.

آنالیز اسپرم براساس معیارهـای سـازمان بهداشـت جهـانی (WHO) و به‌صورت زیر انجام گرفت. بـرای بررسـی تعـداد اسپرم از لام هموسیتومتر استفاده شد. فقط اسپرم‌هایی که دارای سر، ناحیه میانی و دم بودنـد بـا اسـتفاده از بزرگنمـایی ٤٠ × میکروسکوپ نوری شمارش شدند. شمارش برای هـر نمونـه دو بار انجام گرفت و میانگین آن اعلام شـد. نتـایج بـصورت تعداد اسپرم در یک میلی لیتر مایع منی بیان شد [۱۸].

برای مطالعه تحرک اسپرم چهـار کـلاس A، B، C و D در نظر گرفته شد. کلاس A حرکـت پیـشرونده سـریع در مـسیر مستقیم، کلاس B حرکت پیشرونده آرام در مسیر مـستقیم یـا غیرمستقیم، کـلاس C بـدون حرکـت پیـشرونده و کـلاس D بدون حرکـت اسـت. بـرای هـر نمونـه بـا بزرگنمـایی ٤٠ × میکروسـکوپ نـوری ۱۰۰ اسـپرم شـمارش شـد و درصـد اسپرم‌های متحرک (A+B+C) و اسپرم‌های پیـشرونده (A+B) محاسبه شد [۱۹].

برای بررسی مورفولوژی اسپرم بعد از قرار دادن قطره‌ای از محیط کشت حاوی اسپرم روی لام، با لام دیگر اسمیری از آن تهیه شد. اسمیر در دمای اتاق قرار داده شد تـا کمـی خـشک شود، سپس در مخلوط اتـر و الکـل ۹٦ درصـد (۱:۱) تثبیـت شد. در مرحله بعد اسلایدها با رنـگ‌آمیـزی پاپـانیکولا رنـگ شدند. سپس ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ٤٠ × میکروسکوپ نوری بررسی شدند [۲۰]. براساس مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه‌های Normal، Bent tail، Hair pin، Coiled mid piece، Pin head، Double head، Amorphous head، Cytoplasmoc droplet، Coiled tail و Triangulae head قرار گرفتند و ناهنجـاری‌هـا به‌صورت درصد بیان شدند.

برای بررسی قابلیت زنده ماندن اسـپرم ٦- ۵ میکرولیتـر از سوسپانسیون اسپرم روی یک لام گذاشته شد و سپس با یـک قطـره کوچـک از ائـوزین B (۰/۵ درصـد در نرمـال سـالین) مخلـوط شـد. بلافاصـله لامـل گـذاری انجـام گرفـت و بـا بزرگنمایی ٤٠ × میکروسکوپ نوری درصد اسپرم‌هـای زنـده متحرک، زنده غیرمتحرک و مرده تعیین شدند [۲۱].

طـی مرحلـه اسـپرمیوژنز پروتـامین بـه‌جـای هیـستون در کروماتین هسته قرار می‌گیـرد و ایـن جـایگزینی در تـراکم و پایداری اسپرم بـسیار بـا اهمیـت اسـت [۲۲]. بـرای بررسـی کیفیت کروماتین اسپرم از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو اسـتفاده شـد. در این رنگ‌آمیزی اسپرم‌های نابالغ به‌دلیل وجود هیستون زیاد به رنگ آبی در آمده و اسپرم‌های بالغ رنگ کمتری را به خود می‌گیرند. قطره‌ای از محیط کـشت حـاوی اسـپرم را روی لام گذاشته سپس با لام دیگـری اسـمیر از آن تهیـه شـد. بعـد از خشک کردن اسمیر در دمای اتاق، در الکل ۷۰ درصـد تثبیـت شد و سپس رنگ‌آمیزی با آنیلین بلـوی ۵ درصـد بـه‌مـدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای هر نمونه ۱۰۰ اسـپرم بـا بزرگنمـایی ۱۰۰ × میکروسکوپ نوری بررسی شد و درصد اسپرم‌های بـا رنگ گرفتگی کم، متوسط و زیاد بیان شد [۲۰].

بیضه راست از انجماد خـارج و بـه آن اجـازه داده شـد تـا در دمای اتاق گرم شود. سپس دکپـسوله شـده و پارانـشیم آن به‌وسیله دستگاه هموژنایزر در سرعت کـم بـه‌مـدت ٤ دقیقـه [۲۳] در ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین هموژن شد. یک دقیقه اجـازه داده شد تا محلول رسـوب کنـد و سـپس محلـول بـه‌خـوبی مخلوط شد. چند قطره ائـوزین ۱ درصـد بـرای رنـگ‌آمیـزی اسپرماتیـدها به محلول اضـافه شد. بعـد از تکـان دادن نمـونه

جدول ۱. میانگین تعداد اسپرم اپیدیدیم راست، TSN و DSP در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه		
	کنترل (n=۱۰)	شم (n=۱۰)	تجربی (n=۱۰)
تعداد اسپرم اپیدیدیم راست ($\times10^6$/ml)	۳/۵ ± ۱/۲۶	۳/۰۶ ± ۰/۵٤	۱/۵ ± ۰/ ٤۹ *
TSN($\times10^6$/g testis/day)	۸۳/٦ ± ۲۲/۷	۸۱/۸ ± ۲۱	۵۰/۲ ± ۱۵/۳*
DSP($\times10^6$/g testis/day)	۱۷/۱ ± ٤/۷	۱٦/۹ ± ٤/۳	۱۰/٤ ± ۳/۳ *

رنگ شده، ۵ میکرولیتر از محلول روی لام شمارش سلول‌های خونی (هموسیتومتر) گذاشته شد و سرهای اسپرماتیدهای مقاوم در مقابل هموژنیزاسیون شمارش شدند. شمارش دو بار انجام و میانگین گرفته شد. سپس با استفاده از فومول‌های مربوط تعداد اسپرماتیدهای بیضه در هر گرم بافت بیضه (TSN) به‌دست آمد [۲٤ و ۲۵]. تولید روزانه اسپرم (DSP) از طریق تقسیم TSN به ٤/۸٤ (مدت زمانی که اسپرماتیدهای مرحله ۱٦-۱٤ در سیکل اپی تلیوم لوله‌های منی‌ساز موش سوری باقی می‌مانند) به دست آمد [۲٦].

نتایج بین سه گروه کنترل، شم و تجربی مقایسه شدند. نتایج مربوط به تعداد اسپرم اپیدیدیم و DSP بین گروه‌ها با استفاده از آزمون One way ANOVA بررسی شد. درصورت معنی‌دار بودن از آزمون Tukey برای بررسی بیشتر استفاده شد. از آزمون آماری Kruskal-Wallis برای مقایسه کیفیت کروماتین، قابلیت زنده ماندن، تحرک و مورفولوژی اسپرم اپیدیدیم بین گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. $p<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر با بررسی تمام پارامترهای مورد مطالعه، بین گروه کنترل و شم اختلاف آماری معنی داری یافت نشد. نتایج مربوط به تعداد اسپرم اپیدیدیم، DSP و TSN در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروه تجربی و گروه کنترل به‌ترتیب ۰/٤۹ ± ۱/۵×10^6 و ۱/۲٦ ± ۳/۵×10^6 در هر میلی‌لیتر بود. آنالیز آماری از کاهش معنی‌دار میانگین اسپرم اپیدیدیم به‌دنبال تیمار با DEHP حکایت داشت ($p<0.05$). میانگین TSN و DSP در حیوانات تیمار شده با DEHP (به‌ترتیب ۱۵/۳ ± ۵۰/۲×10^6 و ۳/۳ ± ۱۰/٤×10^6) در مقایسه با گروه کنترل (به‌ترتیب ۲۲/۷ ± ۸۳/٦×10^6 و ٤/۷ ± ۱۷/۱×10^6) کاهش نشان داد ($p<0.05$).

میانگین یافته‌های مربوط به درصد تحرک و پیشروندگی اسپرم در جدول ۲ آورده شده است. درصد تحرک و پیشروندگی اسپرم‌ها در گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت ($p<0.05$).

درصد اسپرم‌های زنده متحرک در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) داشت. درصد اسپرم زنده غیرمتحرک در گروه تیمار شده با DEHP در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد ولی این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. درصد اسپرم مرده در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p<0.05$) نشان داد (جدول ۳).

اطلاعات مربوط به کیفیت کروماتین اسپرم در جدول ٤ آورده شده است. درصد اسپرم‌های کم رنگ گرفته دم اپیدیدیم در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد ($p<0.05$). در مقابل درصد اسپرم‌های با رنگ گرفتگی متوسط و زیاد در گروه تیمار شده باDEHP نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد ($p<0.05$).

درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) نشان داد. به علاوه در گروه تجربی درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی

جدول ۲. میانه درصد تحرک و پیشروندگی اسپرم دم اپیدیدیم راست در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه		
	کنترل (n=۱۰)	شم (n=۱۰)	تجربی (n=۱۰)
درصد تحرک	۸۰ (۶۶ –۹۵)	۸۷/۷۵ (۶۵ –۹۴)	۴۰* (۱۱ –۶۰/۵)
درصد پیشروندگی	۴۷/۷۵ (۳۵ –۶۲)	۴۵/۵ (۲۴ –۶۶)	۱۷/۵* (۵ –۳۵/۵)

اعداد داخل پرانتز بیانگر دامنه تغییرات (Minimum-Maximum) هستند.

* :p <0.05 در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۳. میانه درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم دم اپیدیدیم راست در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه		
	کنترل (n=۱۰)	شم (n=۱۰)	تجربی (n=۱۰)
زنده متحرک (٪)	۳۳/۷۵ (۷/۵ –۶۳)	۳۲/۲۵ (۸/۵ –۶۷)	۹* (۴ –۲۳)
زنده غیر متحرک (٪)	۱۱ (۴ –۱۹)	۸/۵ (۴ –۲۱)	۸/۵ (۵ –۱۳)
مرده (٪)	۵۰/۵ (۳۳ –۸۰/۵)	۴۶/۷۵ (۲۷ –۸۶)	۸۱/۵* (۶۵ –۹۱)

اعداد داخل پرانتز بیانگر دامنه تغییرات (Minimum-Maximum) هستند.

* :p <0.05 در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۴. میانه کیفیت کروماتین اسپرم دم اپیدیدیم راست در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه		
	کنترل (n=۱۰)	شم (n=۱۰)	تجربی (n=۱۰)
کم رنگ گرفته (٪)	۶۶/۷۵ (۵۲/۵ –۸۱)	۷۳/۵ (۵۵/۵ –۸۶/۵)	۳۸* (۱۵ –۷۵)
متوسط رنگ گرفته (٪)	۳۳/۷۵ (۱۸ –۴۲)	۲۳/۵ (۱۲/۵ –۴۱)	۵۲* (۲۱ –۶۹)
زیاد رنگ گرفته (٪)	۲ (۰/۵ –۵/۵)	۱ (۰ –۵)	۸/۵* (۴ –۱۷)

اعداد داخل پرانتز بیانگر دامنه تغییرات (Minimum-Maximum) هستند.

* :p <0.05 در مقایسه با گروه کنترل

غیرطبیعی hair pin نسبت به گروه کنترل افزایش داشت و این از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۵). در تمامی گروه‌ها کمترین درصد ناهنجاری مورفولوژیکی مربوط به Double head ، Pin head ، Ctoplasmic droplet و Triangular head و بیشترین درصد ناهنجاری مربوط به Hair pin و Coiled-mid piece بود.

بحث

DEHP یکی از فراوانترین فتالات‌ها است و مشخص شده است که باعث ایجاد اختلالات تولیدمثلی و تکاملی در مدل‌های جوندگان می‌شود [۱۳]. با توجه به استفاده گسترده از فتالات‌ها و سمیت‌زایی آن‌ها برای بسیاری از دستگاه‌های بدن از جمله دستگاه تولیدمثلی، بررسی آثار آن‌ها دارای اهمیت علمی واجتماعی است [۱] .

جدول ۵. میانه یافته‌های مورفولوژیک اسپرم دم اپیدیدیم راست در گروه‌های مورد مطالعه

یافته‌های مورفولوژیک (٪)	گروه		
	کنترل (n=۱۰)	شم (n=۱۰)	تجربی (n=۱۰)
Normal	۶۰/۵ (۴۴-۸۲/۵)	۶۱ (۳۷-۷۱)	۴۵/۵* (۲۸-۶۰)
Coiled mid piece	۱۵ (۱۶/۵-۲۵)	۱۲/۵ (۱۱-۲۲/۵)	۱۴ (۱۱-۱۹)
Hair pin	۱۱/۷۵ (۴-۳۲)	۱۸ (۱۰/۵-۳۶)	۳۱/۵* (۱۲-۴۵)
Bent tail	۳ (۰-۹)	۴ (۰-۸)	۲ (۱-۱۰)
Coiled tail	۳ (۰-۶)	۱ (۰-۳)	۳ (۱-۵)
Double head	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)
Amorphus head	۱/۲۵ (۰-۳)	۱/۵ (۰-۶)	۰ (۰-۰)
Triangular head	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)
Pin head	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)	۰ (۰-۰)
Cytoplasmic droplet	۰ (۰-۰)	۰/۷۵ (۰-۱)	۰ (۰-۰)

اعداد داخل پرانتز بیانگر دامنه تغییرات (Minimum-Maximum) هستند.

* :$p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل

در مطالعه حاضر در توافق با مطالعه قبلی [۲۷] استفاده از روغن ذرت هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای مورد مطالعه نداشت. با این وجود تیمار موش‌های سوری نر با ۲g DEHP/kg باعث کاهش در تعداد، تحرک، قابلیت زنده ماندن، کیفیت کروماتین اسپرم و مورفولوژی طبیعی اسپرم اپیدیدیم شد. همچنین مقادیر DSP و TSN نیز کاهش یافت.

مدت یک چرخه اپی‌تلیوم منی‌ساز در موش سوری حدود ۸/۶ روز است [۲۸]. در این مطالعه موش‌های سوری به‌مدت ۱۴ روز تحت تیمار با DEHP قرار گرفتند. بنابراین تمام سلول‌های رده اسپرماتوژنیک تقریباً برای ۱/۵ چرخه اپی‌تلیوم منی‌ساز تحت تاثیر DEHP بودند.

تعداد اسپرم اپیدیدیم و تعداد اسپرماتید بیضه از فاکتورهای مهمی هستند که برای تعیین تاثیر یک ماده بر اسپرماتوژنزیس به‌کار می‌روند [۲۹]. تمایز سلول‌های زایا، میوز و تغییر شکلشان به اسپرم بالغ با عملکرد سلول سرتولی ارتباط مستقیم دارد [۳۰]، حال آنکه سلول سرتولی هدف اولیه DEHP در بیضه جوندگان است و می‌تواند موجب اختلال در ساختار و عملکرد سلول سرتولی شود [۹]. لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۰ با بررسی دوز منفرد DEHP بر نوزادان نر سه روزه موش‌های صحرایی بیان کردند DEHP سبب کاهش تکثیر سلول‌های سرتولی و کاهش تعداد گونوسیت‌ها می‌شود [۳۱].

در مطالعه حاضر DEHP باعث کاهش DSP ، TSN و تعداد اسپرم اپیدیدیم موش سوری شده است. این نتایج با یافته‌های دستال (Dostal) و همکاران در سال ۱۹۸۸ [۳۲] و کانگ (Kang) و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۳۳] همخوانی دارد. آن‌ها بیان کردند که DEHP باعث کاهش تعداد اسپرماتید بیضه و اسپرم اپیدیدیم می‌شود. اختلال در عملکرد سلول‌های سرتولی و سنتز DNA معیوب در سلول‌های زایا منجر به ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنزیس می‌شود [۳۴] و به‌دنبال

آن می‌توانیم افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم را شاهد باشیم [۳۰]. گاندینی (Gandini) و همکاران در سال ۲۰۰۰ بیان کردند که عملکرد اسپرم با مورفولوژی آن ارتباط مستقیم دارد [۳۵]. بنابراین مورفولوژی طبیعی اسپرم لازمه تحرک پیشرونده اسپرم محسوب می‌شود و تحرک اسپرم بهترین نشانه برای میزان باروری در جنس مذکر است [۱۹]. همان‌طور که بیان شد DEHP سبب ایجاد اختلال در ساختار و عملکرد سلول‌های سرتولی [۳۶] و کاهش تعداد سلول‌های زایا [۳۱] می‌شود. متعاقب آن DEHP می‌تواند باعث افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و کاهش تعداد اسپرم‌ها شود. آگاروال (Agarwal) و همکاران گزارش کردند که DEHP باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم و افزایش مورفولوژی‌های ناهنجار اسپرم می‌شود [۳۷]. این نتایج در سال ۲۰۰۶ توسط کانگ (Kang) و همکاران تأیید شد [۳۳]. یافته های حاصل از بررسی اخیر نیز از کاهش درصد مورفولوژی‌های طبیعی، تحرک و پیشروندگی اسپرم اپیدیدیم موش‌های سوری به‌دنبال تیمار با DEHP حکایت دارد. در این مطالعه برای بررسی قابلیت زنده ماندن اسپرم از رنگ‌آمیزی فوق حیاتی ائوزین B (۰/۵ درصد در نرمال سالین) استفاده شد. در گروه تیمار شده با DEHP این پارامتر به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان داد. طی مرحله اسپرمیوژنز، پروتامین به‌جای هیستون در کروماتین هسته اسپرم قرار می‌گیرد. این جایگزینی در تراکم و پایداری کروماتین اسپرم نقش دارد [۲۰]. در این تحقیق برای بررسی کیفیت کروماتین اسپرم (جابه‌جایی مناسب پروتامین با هیستون) از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. افزایش قابل ملاحظه رنگ‌پذیری هسته اسپرم به آنیلین بلو در گروه تیمار شده با DEHP نمایانگر کاهش کیفیت کروماتین اسپرم بود.

براساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه DEHP دارای آثار سمی بر پارامترهای اسپرم (شامل تعداد، تحرک، قابلیت زنده ماندن، مورفولوژی و کیفیت کروماتین) اپیدیدیم است و گمان می‌رود بتواند باروری در جنس مذکر را تحت تاثیر قرار دهد.

References

1. **Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al.** Phthalate exposure and human semen parameters. Epidemiol 2003; 14(3): 269-77.
2. **Eimani H, Dalman A, Sepehri H, Kazemi S, Hassani F, Rezazadeh M, et al.** Effect of DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) on resumption of meiosis and in vitro maturation of mouse oocytes and development of resulting embryos. Yakhteh Med J 2005; 7(2): 56-61.
3. **Grasso P, Heindel JJ, Powel CJ, Reichert LE.** Effect of mono(2-ethylhexyl) phthalate, a testicular toxicant, on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultured rat sertoli cells. Biol Reprod 1993; 48(3): 454-9.
4. **Lundburg G, Nilsson C.** Phthalic acid esters used as plastic additives. Swedish National Chemical Inspectorate 1994, Report No 12/94.
5. **Elsisi AE, Carter DE, Sipes IG.** Dermal absorption and tissue distribution of phthalate esters. Toxicologist 1985; 5: 246-51.
6. **Stringer RL, Labounskaia I, Santillo D, Johnston PA, Siddorn J, Stephenson A.** Determination of the composition and quanity of phthalate ester additives in PVC childrens toys. Research Laboratories Technical Note 1997, 06/97.
7. **Albro P.** Absorption, metabolism, and excretion of Di-(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. Environ Health Perspect 1986; 65: 293-8.
8. **David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D.** Chronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in mice, Toxicol Sci 2000; 58(2): 377-85.
9. **Keys DA, Wallace DG, Kepler TB, Conolly RB.** Quantitive evaluation of alternative mechanisms of blood and testes disposition of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate. Toxicol Sci 1999; 49(2): 172-85.

10. **Anasa IMK, Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S.** Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate on bovine oocyte maturation in vitro. Reprot Toxicol 2003; 17: 305-10.
11. **Lovecamp- Swan T, Davis BJ.** Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environ Health Perspect 2003; 111(2): 139-45.
12. **Shaffer CB, Carpenter CP, Smyth HF Jr.** Acute and aubacute toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate with note upon its metabolism. J Ind Hyg Toxicol 1945; 27: 130-5.
13. **Park JD, Habeebu SS, Klaassen CD.** Testicular toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague- Dawley rats. Toxicol 2002; 171: 105-15.
14. **Parmar D, Srivastava SP, Seth PK.** Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. Toxicology 1986 42(1): 47-55.
15. **Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, et al.** Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di (2-ethylhexyl) phthalate. Biol Reprod 2001; 65(4): 1252-9.
16. **Andriana BB, Tay WT, Maki I, Awal MA, Kanai Y, Kurohmaru M, et al.** An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2- ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat in vitro. J Vet Sci 2004; 5(3): 235-40.
17. **Ablake M, Itoh M, Terayama H, Hayashi S, Shoji S, Naito M, et al.** Di (2-ethylhexyl) phthalate induces severe aspermatogenesis in mice however subsequent antioxidant vitamins supplementation accelerates regeneration of the seminiferous epithelium. Int J Androl 2004; 27(5): 274-81.
18. **Robb GW, Amann RP, Killian GJ.** Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. J Reprod Fertil 1978; 54(1): 103-7.
19. **Dada R, Gupta NP, Kucheria K.** Deteriration of sperm morphology in men exposed to high temperature, J Anat Soc India 2001; 50(2): 107-11.
20. **Rezazadeh Valoujerdi M.** Intra Cytoplasmic Sperm Injection. 1th ed, Boshra Press, 2002, pp 27-34. (Persian)
21. **Rashidi I, Movahedi M, Tiraihi T.** The effect of pentoxifyline on mouse epididymal sperm parameters, fertilization, and cleavage rats after short time preservation. Ir J Reprod Med 2004; 2(2): 51-7.
22. **Bauer M, Leigh C, Peirce E, Breed WG.** Comparative study of sperm chromatin condensation in the excurrent ducts of the laboratory mouse musculus and spinifex hopping mouse Notomys alexis. Reprod Fertil Develop 2005; 17(6): 611-6.
23. **Mortimer ST.** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Hum Reprod Update 1997; 3(5): 403-39.
24. **Li GX, Kang KS, Lee YS.** 2- bromopropane induced germ cell apoptose during spermatogenesis in male rat. J Vet Med Sci 2001; 63(4): 373-82.
25. **Xu LC, Zhan NY, Liu R, Song L, Wang XR.** Joint action of phoxim and fenvalerate on reproduction in male rats. Asian J Androl 2004; 6(4): 337-41.
26. **Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL, Buchanan DL, Cooke PS, Preziosi D, et al.** Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenataly to subclinical doses of 17 α-ethinyl estradiol, Hum Reprod 2001; 16(5): 988-96.
27. **Eimani H, Zare Z, Dashtnavard H, Ghasemi A, Faghihzade S, Mofid M, et al.** The effect of corn oil on mouse NMRI sperm parameters. J Ir Anat Sci 2006; 3: 277-88. (Persian)
28. **Hess RA, Chen P.** Computer tracking of germ cells in the cycle of the seminiferous epithelium and prediction of changes in cycle duration in animals commonly used in reproductive biology and toxicology. J Androl 1992; 13(3): 185-90.
29. **Ban Y, Komatsu T, Kemi M, Inagaki S, Nakatsuka T, Matsumoto H.** Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. Exp Anim 1995 44(4): 315-22.
30. **Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi**

T, Nagamura Y. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. J Toxicol Sci 2001; 26(1): 51-9.

31. **Li LH, Jester WF, Laslett AL, Orth JM.** A single dose of di(2-ethylhexyl)-phathalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decrease cyclin D_2 expression. Toxicol Appl pharmacol 2000; 166: 222-9.
32. **Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA.** Testicular toxicity and reduced sertoli cell numbers in neonatal rats by di (2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. Toxicol Appl Pharmacol 1988; 95(1): 104-21.
33. **Kang JS, Morimura K, Toda C, Wanibuchi H, Wei M, Kojima N, et al.** Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. Reprod Toxicol 2006; 21(3): 253-9.
34. **Nambu A, Kumamoto Y.** Effect of follicle stimulating hormone (FSH) on protection or acceleration to recovery from spermatogenic damage induced by anti-cancer agents. Nippon- Hinyokika- Gakkai-Zasshi 1995; 86: 1231-9.
35. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Copenecchia L, Familiari G, Verlengia C.** Study of appropriate DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15(4): 830-9.
36. **Dirven HA, Van den Broek PH, Arends AMM.** Metabolites of the plastizer di(2-ethylhexyl) phthalate in urine samples of workers in polyvinylchloride processing industries. Int Arch Occup Environ Health 1993; 64(8): 549-54.
37. **Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC, Reel JR, Kluwe WM.** Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. Environ Health Perspect 1986; 65: 343-50.