IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۱ (۲)، ۷۹- ۷۱ تابستان ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

اثر تزریق داخل رحمی آندروژن بر سیستم تولیدمثلی و تغییرات هورمونی در زاده های ماده بالغ موش های صحرایی

مهسا نوروززاده[۱]، فهیمه رمضانی تهرانی[۱*]، آزیتا زاده وکیلی[۲]، عباس پیریایی[۳]، فریدون عزیزی[۴]

۱. مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولید مثل، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۴. مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، پژوهشکده ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۷ خرداد ۹۴ پذیرش: ۲۵ مرداد ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات هورمونی در دوره های بحرانی تکامل جنینی می توانند منجر به تغییراتی در فیزیولوژی یا مورفولوژی یک اندام شوند. هدف مطالعه حاضر، بررسی سیستم تولیدمثلی در موش‌های صحرایی ماده‌ای بود که در یک روز پایانی از دوره تکامل جنینی، در معرض تک‌دوزی از تستوسترون قرار گرفته بودند.

روش‌ها: به موش های صحرایی باردار در روز ۲۰ بارداری، در گروه آزمایشی ۲۰ میلی گرم تستوسترون در یک میلی لیتر حلال و در گروه کنترل فقط حلال، به صورت زیر جلدی تزریق شد. وزن بدن زاده های ماده، در روز اول تولد، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزگی از سن و در بزرگسالی و فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی در روزهای ۶، ۳۰ و ۶۰ روزگی از سن تعیین شدند. هورمون ها و مورفولوژی سیستم تولیدمثلی و بافت تخمدان در این زاده ها در بزرگسالی بررسی شدند. مقایسه دو گروه با استفاده از Independent-sample student *t*-test انجام شد.

یافته‌ها: در زاده های گروه آزمایشی، فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی، طول کلیتوریس، غلظت هورمون های تستوسترون و لوتئینیزان به طور معنی داری افزایش پیدا کردند و غلظت استرادیول و آنتی مولرین هورمون کاهش پیدا کردند ($p < ۰/۰۵$). در زاده های گروه آزمایشی، تعداد فولیکول های پره آنترال و آنترال افزایش و فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری و جسم‌های زرد کاهش نشان دادند اما این افزایش و کاهش معنی‌دار نبودند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که در معرض قرار دادن جنین‌های ماده با تک دوزی از تستوسترون در روز ۲۰ تکاملشان منجر به بروز برخی تغییرات تکاملی در سیستم تولیدمثلی خارجی و بروز اختلال در ترشح هورمون ها در بزرگسالی می شود.

واژه‌های کلیدی : تستوسترون، زندگی پیش از تولد، سیستم تولیدمثلی، موش صحرایی ماده

مقدمه

مطالعات سال های اخیر موید آن است که اختلالاتی که در طول دوره های بحرانی تکامل جنینی رخ می دهند ممکن است باعث تغییرات همیشگی یا طولانی مدت در فیزیولوژی یا مورفولوژی یک اندام شوند [۱]. این مطالعات از مفهوم برنامه ریزی جنینی (Fetal programming) حمایت می کنند. بر اساس این مفهوم، در طول تکامل داخل رحمی، جنین ممکن است برای تکامل و ظهور بیماری ها در بزرگسالی برنامه ریزی شود و به عبارتی دیگر، بروز برخی از بیماری ها در دوران بزرگسالی از همان دوران جنینی برنامه ریزی شده است. بر این اساس، استعداد برای ظهور بیماری ها از جمله بیماری های

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: ramezani@endocrine.ac.ir
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

تولیدمثلی و اختلالات عملکردی، بوسیله هورمون ها، رژیم غذایی، در معرض قرار گرفتن محیطی با عوامل سمی و استرس ها در طول دوره های جنینی و روزهای اولیه پس از تولد شکل می گیرند. تکامل و رشد در دوره های داخل رحمی و روزهای اولیه پس از تولد، وابسته به وضعیت هورمونی، متابولیکی و تغذیه ای است که از طرف مادر در طول دوره های بارداری و شیردهی فراهم می شود [۲].

سندرم تخمدان پلی کیستیک یکی از شایع ترین اختلالات اندوکرینی در زنان است، شیوع این سندرم ۱۰-۵٪ در سنین تولیدمثلی گزارش شده است [۳]. مهم ترین اختلالات تولیدمثلی و متابولیکی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک شامل نازایی، کاهش یا عدم تخمک گذاری، افزایش ترشح آندروژن، افزایش ترشح هورمون لوتئینیزان (LH)، تخمدان های پلی کیستیک و افزایش مقدار انسولین (هیپرانسولینمیا) می‌باشند [۴].

مطالعات قبلی انجام شده بر روی انسان و حیوانات [۵، ۶]، نشان داده اند که در معرض قرار گرفتن انسان یا حیوان ماده با هورمون های آندروژن در طول مراحل اولیه زندگی (دوره پیش از تولد، دوره پری ناتال و مراحل اولیه پس از تولد) می تواند باعث بروز اختلالاتی در سیستم تولید مثلی شود. از جمله این اختلالات می توان به افزایش ترشح آندروژن، افزایش ترشح LH، تخمدان های پلی کیستیک، کاهش تخمک گذاری و برخی علائم دیگر اشاره کرد و این اختلالات مشابه سندرم تخمدان پلی کیستیک می باشند. همچنین در معرض گذاری با آندروژن در شرایط اولیه تکاملی باعث بروز تغییراتی در فنوتیپ تولیدمثلی ماده در بزرگسالی می شود. آزمایشات انجام شده بر روی حیوانات نشان داده اند که افزایش آندروژن ممکن است بر روی عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد اثر گذاشته و منجر به اختلال در عملکرد سیستم تولیدمثلی در دوره بزرگسالی شود [۴]. هدف از انجام مطالعه حاضر پاسخ به این سوال بود که آیا در معرض قرار دادن موش های صحرایی ماده با تک دوزی از تستوسترون، فقط در طی یک روز از روزهای پایانی دوره بحرانی تکامل جنینی، می‌تواند منجر به بروز اختلالاتی در ساختار و عملکرد سیستم تولیدمثلی و بروز علائمی شبیه به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در بزرگسالی شود یا خیر.

مواد و روش‌ها

حیوانات

شانزده سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار، با محدوده وزن بدنی ۱۹۰-۱۷۰ گرم و در محدوده سنی ۹۰-۷۰ روزگی از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی پژوهشکده‌ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شدند. یک جفت حیوان نر و ماده به مدت ۲۴ ساعت در یک قفس (با ابعاد ۱۵ cm × ۳۰ cm × ۴۳ cm) در شرایط استاندارد و کنترل شده محیطی (دما ۳ ± ۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵٪-۴۵٪ و چرخه های تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته) جهت جفت گیری نگهداری شدند. با مشاهده پلاگ واژنی، روز یک بارداری در حیوانات ماده تأیید شد. موش‌های صحرایی باردار به طور تصادفی به دو گروه (شامل ۸ موش باردار در هر گروه) شامل آزمایشی و کنترل تقسیم شدند. کنترل، نگهداری و روش جراحی حیوانات بر طبق اصول استاندارد کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. مطالعه حاضر بوسیله کمیته ی اخلاق پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تأیید قرار گرفت (کد مصوبه کمیته اخلاق ۳۲۰).

تیمار هورمونی حیوانات باردار

در گروه آزمایشی، به موش‌های صحرایی باردار در روز ۲۰ بارداری، ۲۰ میلی گرم تستوسترون که در یک میلی لیتر حلال (روغن کنجد و بنزیل بنزوات به نسبت ۴/۱) حل شده بود به صورت زیر جلدی تزریق شد. (فری تستوسترون: T1500، روغن کنجد: S3547 و بنزیل بنزوات: B6630 از شرکت سیگما کشور آلمان خریداری شدند). در گروه کنترل به موش های صحرایی باردار در روز ۲۰ بارداری فقط یک میلی لیتر حلال به صورت زیر جلدی تزریق شد. زاده های ماده متولد شده از این حیوانات باردار، پس از دوره شیرخوارگی از مادرشان جدا شده و در قفس های جداگانه در شرایط استاندارد و کنترل شده محیطی نگهداری شدند. این زاده های ماده از نظر تکامل و عملکرد سیستم تولیدمثلی در محدوده سنی ۱۰۰-۹۰ روز (دوره بزرگسالی) مورد بررسی قرار گرفتند و فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی (Anogenital distance (AGD, که فاصله بین لبه سری مقعد تا پایه کلیتوریس بر

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

حسب میلی متر می باشد در روزهای ۶۰، ۳۰، ۶ از سنشان اندازه‌گیری شد.

تعیین وزن بدن، ویژگی های مورفولوژیکی و وزن تخمدان ها

وزن بدن زاده های ماده در روز اول تولد و ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ روزگی از سنشان با استفاده از ترازو اندازه گیری شد. فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی بر حسب میلی متر با استفاده از ورنیه در روزهای ۶، ۳۰، ۶۰ از سنشان تعیین شد. در بزرگسالی همه ویژگی‌های مورفولوژیکی شامل فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی، طول کلیتوریس، تعداد نوک پستان، طول واژن و فاصله تخمدان تا کلیه اندازه گیری شدند. زاده های ماده ای که در طول دوره جنینی در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند از نظر وجود اندام های مردانه شامل غده پروستات، وزیکول سمینال و غدد کوپر بررسی شدند. وزن بدن و تخمدان ها نیز تعیین شدند. وزن مطلق تخمدان ها بوسیله ترازوی دیجیتال (Sartorius, Germany) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد.

نمونه‌گیری خون و جداسازی سرم

زاده‌های ماده در بزرگسالی با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (P3761، سیگما، آمریکا) با غلظت ۶۰ میلی گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن حیوان بیهوش شدند. پس از بیهوشی عمیق، شکم حیوان باز شده و نمونه خون حیوان از آئورت شکمی گرفته شد. نمونه‌های خون در میکروتیوب های مخصوص سانتریفیوژ، ریخته شده و در دور چرخش ۱۰۰۰۰، در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم خون جدا شدند و این نمونه ها برای سنجش هورمون های تستوسترون (T)، هورمون لوتئینیزان (LH)، هورمون محرک فولیکولی (FSH)، استرادیول (E2)، پروژسترون (P4)، آنتی مولرین هورمون (AMH) و گلوبولین باند کننده هورمون جنسی (SHBG) مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش هورمون ها به روش الایزا

برای سنجش غلظت هورمون ها در سرم خون به روش الایزا، از کیت های اختصاصی موش های صحرایی که برای هر هورمون جداگانه تهیه شده بودند استفاده شد. تغییرات غلظت هر هورمون در داخل هر کیت (Intra assay) کم تر از ۱۰٪ بود. تمام کیت های مورد استفاده از شرکت CUSABIO BIOTECH، کشور ژاپن خریداری شدند.

آماده سازی مقاطع بافتی تخمدان

پس از بیهوشی عمیق حیوان و بلافاصله پس از این که نمونه خون حیوان گرفته شد، حیوانات با برش زدن قلبشان کشته شدند. پس از مرگ حیوانات تخمدان های حیوانات برداشته شده و در فرمالین ۱۰٪ به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از تثبیت کامل تخمدان ها، تخمدان ها به دستگاه پردازش کننده بافتی انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت پردازش بافتی انجام شد. پس از مرحله پردازش بافتی، نمونه های تخمدان در بلوک هایی از جنس پارافین قرار داده شدند. با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطعی از بافت تخمدان با ضخامت ۴ میکرومتر تهیه شد. مقاطع بافتی با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین (به روش معمولی) رنگ آمیزی شدند. نمونه های بافتی آماده از تخمدان، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد فولیکول های پره آنترال، آنترال، فولیکول های پیش از تخمک گذاری و همچنین تعداد جسم های زرد در ۵ مقطع بافتی از هر تخمدان با فاصله حداقل ۲۰ میکرومتر از همدیگر مورد شمارش قرار گرفتند [۴]. تعداد فولیکول ها و جسم های زرد در مقاطعی از تخمدان با اندازه تقریبا مساوی بین دو گروه آزمایشی و کنترل شمرده شدند. برای جلوگیری از هرگونه خطای احتمالی در شمارش فولیکول‌ها، فولیکول ها بوسیله دو شخص مورد شمارش قرار گرفتند و همچنین فقط فولیکول هایی که حاوی یک تخمک قابل روئیت بودند مورد شمارش قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات بر اساس میانگین و خطای استاندارد (mean ± SEM) گزارش شده اند. برای مقایسه نتایج بین دو گروه از آزمون Independent-sample student *t*-test، استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نسخه ۱۵ نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

جدول ۱- وزن بدن زاده ها در گروه های کنترل و آزمایشی در روزهای مختلف از سن

سن	وزن بدن (گرم)	
	کنترل (تعداد = ۱۱)	آزمایشی (تعداد = ۹)
روز اول تولد	۵/۷۴ ± ۰/۱۱	۵/۷۸ ± ۰/۱
۱۵ روزگی	۲۱/۷۲ ± ۰/۴۴	۲۴/۱۱ ±۱/۸۷
۳۰ روزگی	۵۷/۲۷ ± ۳/۶۵	۵۴/۷۷ ± ۳/۶۸
۴۵ روزگی	۸۷ ± ۴/۳۷	۸۰ ± ۲/۵۸
۶۰ روزگی	۱۲۵/۹ ± ۵/۳۵	۱۳۵± ۴/۸۷
بزرگسالی	۱۶۲/۴۵ ± ۵/۶۹	۱۷۸/۴۴ ± ۹/۴۴

مقایسه دو گروه با آزمون independent-sample student *t*-test انجام شد. مقادیر بر اساس میانگین و خطای استاندارد میانگین می باشند. دوره بزرگسالی: ۱۰۰-۹۰ روزگی از سن .

یافته‌ها

وزن بدن، ویژگی‌های مورفولوژیکی و وزن تخمدان‌ها

تغییرات در وزن بدن، در زاده های گروه آزمایشی و کنترل در جدول ۱ ارائه شده است. وزن بدن زاده های هر دو گروه در زمان هایی که اندازه گیری شدند تفاوت معنی داری نشان ندادند.

ویژگی‌های مورفولوژیکی و وزن تخمدان ها

ویژگی های مورفولوژیکی و وزن تخمدان ها در جدول ۲ ارائه شده است. بر طبق نتایج به دست آمده فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی و طول کلیتوریس، در زاده‌های گروه آزمایشی در مقایسه با زاده های گروه شم به طور معنی داری افزایش پیدا کردند ($p < ۰/۰۰۱$ و $p < ۰/۰۵$ به ترتیب). طول واژن و تعداد نوک پستان در زاده های هر دو گروه تفاوت معنی‌دارینشان ندادند. سوراخ واژن در زاده های گروه آزمایشی که در دوران جنینی در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند بعد از بلوغ باز نشده بود. اندام های تولیدمثلی نر شامل غده پروستات، وزیکول سمینال و غدد کوپر در زاده های گروه آزمایشی مشاهده نشدند.

غلظت هورمون‌ها

در زاده‌های گروه آزمایشی، غلظت هورمون‌های تستوسترون (۰/۳۲ ± ۲/۶۹) و لوتئینیزان (LH) (۰/۵۹ ± ۷/۲۷) در مقایسه با زاده های گروه شم (غلظت تستوسترون ۰/۱۷ ± ۱/۷۱ و غلظت LH ۰/۵۵ ± ۵/۲۰) به طور معنی داری افزایش پیدا کردند ($p < ۰/۰۵$)، در حالی که غلظت هورمون های استرادیول (۴/۸۲ ± ۱۷/۸۴، $p < ۰/۰۵$) و آنتی‌مولرین هورمون (۰/۰۴ ± ۰/۷۹، $p < ۰/۰۰۱$) به طور معنی داری در مقایسه با زاده‌های گروه کنترل (غلظت استرادیول ۲/۴۳ ± ۳۱/۳۲ و غلظت آنتی‌مولرین هورمون ۱۰/۴۱ ± ۸۱/۵۶) کاهش پیدا کردند (جدول ۳).

جدول ۲- ویژگی های مورفولوژیکی و وزن تخمدان ها در زاده های گروه های کنترل و آزمایشی

متغییر	گروه	
	کنترل(تعداد = ۱۱)	آزمایشی(تعداد = ۹)
AGD در ۶ روزگی از سن (میلی متر)	۲/۶۳±۰/۱۵	۴±۰/۲۸ ***
AGD در ۳۰ روزگی از سن (میلی متر)	۸/۶۳±۰/۲۷	۱۲/۸۸±۰/۷۷ ***
AGD در ۶۰ روزگی از سن (میلی متر)	۱۰/۸۱±۰/۲۶	۱۶±۰/۶۶ ***
AGD دربزرگسالی (میلی متر)	۱۱±۰/۳۸	۱۶/۲۲±۰/۵۷ ***
طول کلیتوریس (میلی متر)	۴/۹۰±۰/۳۶	۶/۳۳±۰/۵۷ *
طول واژن (میلی متر)	۱۳/۲۷±۰/۷۶	۱۳/۶۶±۰/۲۳
تعداد نوک پستان	۱۲± ۰	۱۲±۰
فاصله کلیه تا تخمدان (میلی متر)	۵/۶۳±۰/۵۷	۴/۶۶±۰/۶۶
وزن مطلق تخمدان ها (گرم)	۰/۱۱±۰	۰/۱۲±۰/۰۱
وزن نسبی تخمدان ها	۰/۰۰۰۳±۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۷±۰/۰۰۰۰۴

مقایسه دو گروه با آزمون independent-sample student *t*-test انجام شد. مقادیر بر اساس میانگین و خطای استاندارد میانگین (mean ± SEM) می باشند. Anogenital distance (AGD) فاصله بین لبه سری مقعد تا پایه کلیتوریس. بزرگسالی: س ۱۰۰-۹۰ روزگی. وزن نسبی برابر است با وزن اندام (گرم)/وزن بدن (گرم). *: تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۵$ و ***: تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

جدول ۳- غلظت هورمون‌ها در سرم خون زاده‌های گروه‌های کنترل و آزمایشی در بزرگسالی (سن ۱۰۰-۹۰ روزگی)

هورمون	گروه	
	شم (تعداد=۱۱)	آزمایشی (تعداد=۹)
تستو سترون (T) ng/ml	۱/۷۱ ± ۰/۱۷	*۲/۶۹ ± ۰/۳۲
لوتئینیزان(LH) mlU/ml	۵/۲۰ ± ۰/۵۵	*۷/۲۷ ± ۰/۵۹
هورمون محرک فولیکولی(FSH) mlU/ml	۶۸/۵۹ ± ۴/۷۶	۶۶/۵۷ ± /۰۰
LH/FSH	۰/۰۸ ± ۰/۰۱	۰/۱۲ ± ۰/۰۱
استرادیول (E2) pg/ml	۳۱/۳۲ ± ۲/۴۳	*۱۷/۸۴ ± ۴/۸۲
پروژسترون (P4) ng/ml	۶۷/۴۳ ± ۶/۹۰	۶۴/۵۵ ± ۷/۱۸
آنتی مولرین هورمون (AMH) ng/ml	۸۱/۵۶ ± ۱۰/۴۱	***۰/۷۹ ± ۰/۰۴
گلوبولین باند کننده هورمون جنسی (SHBG) pmol/ml	۲۸/۸۱ ± ۲/۴۹	۲۸/۸۱ ± ۰/۹۲

مقایسه دو گروه با آزمون Independent-sample student *t*-test انجام شد. مقادیر بر اساس میانگین و خطای استاندارد میانگین می باشند. *: تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p<۰/۰۵$ و ***: تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p<۰/۰۰۱$.

بافت تخمدان

تعداد فولیکول های پره آنترال (۱/۳۷ ± ۷/۴۰) و آنترال (۲/۱۴ ± ۱۵/۶۰)، در زاده‌های گروه آزمایشی در مقایسه با زاده های گروه شم (تعداد فولیکول های پره آنترال ۰/۹۹ ± ۳/۴۴ و آنترال ۲/۶۰ ± ۱۰) افزایش و تعداد فولیکول های پیش از تخمک گذاری و تعداد جسم های زرد کاهش نشان دادند اگرچه این افزایش و کاهش معنی‌دار نبودند (جدول ۴ و شکل ۱).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که در معرض قرار گرفتن جنین‌های ماده با تک‌دوزی از تستوسترون در روز ۲۰ تکامل منجر به بروز برخی از تغییرات تکاملی در سیستم تولیدمثلی خارجی، بروز اختلالاتی در ترشح هورمون ها و همچنین تغییراتی در بافت تخمدان‌ها در طول بزرگسالی می‌شود که شبیه به تغییرات ایجاد شده در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌باشد. در سیستم تولیدمثلی ماده گیرنده‌های آندروژنی وجود دارند، به همین علت در معرض قرار گرفتن جنین های ماده با آندروژن قبل از تکامل نهایی سیستم تولیدمثلی، می‌تواند منجر به مورفولوژی شبه مردانه در سیستم تولیدمثلی خارجی شود. تغییرات ایجاد شده در فنوتیپ تولیدمثلی ماده به دنبال در معرض گذاری با آندروژن در زندگی پیش از تولد در بسیاری از مطالعات قبلی گزارش شده است. در مطالعه حاضر، مهم ترین تغییرات در سیستم تولیدمثلی خارجی در زاده های ماده گروه آزمایشی شامل تغییرات در فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی (AGD)، طول کلیتوریس و عدم باز شدن سوراخ واژن بود که این تغییرات در سیستم تولیدمثلی خارجی مشابه یافته های مشاهده شده در برخی از مطالعات قبلی می باشند [۴]. اگرچه در برخی از مطالعات قبلی، وجود بافت های شبه مردانه مانند پروستات در حیوانات ماده ای که در معرض آندروژن قرار گرفته بودند گزارش شده است [۷]، ما در مطالعه حاضر بافت شبه مردانه ای در سیستم تولیدمثلی زاده های ماده مشاهده نکردیم. این اختلاف بین مطالعه ما و مطالعات قبلی، شاید به علت اختلاف در زمان در معرض گذاری با آندروژن، مقدار آندروژن، طول مدت در معرض گذاری با آندروژن، نوع آندروژن و یا نژاد حیوان بوده است.

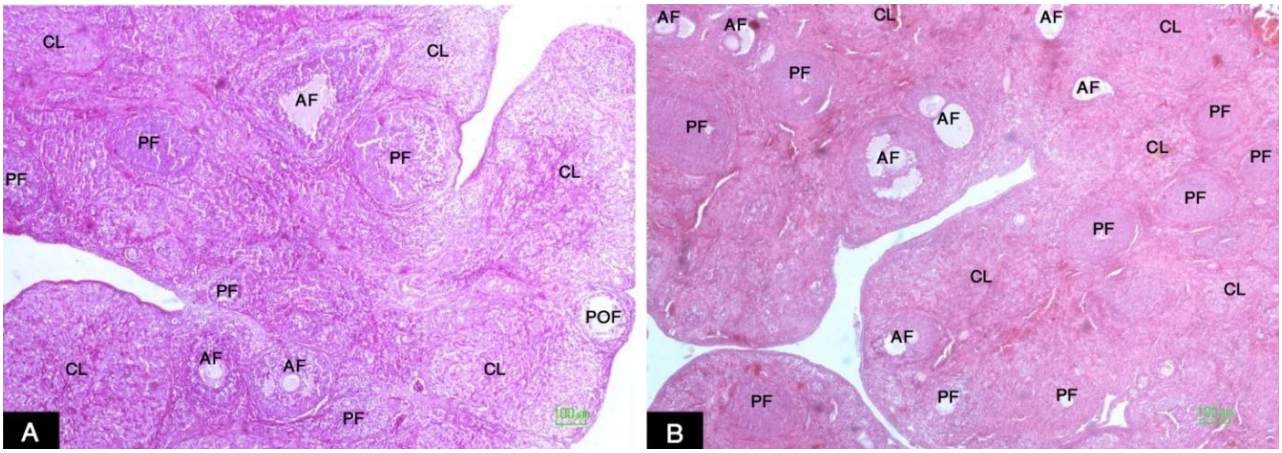
در مطالعه حاضر، غلظت سرمی LH در زاده‌های گروه آزمایشی در دوره بزرگسالی، افزایش پیدا کرده بود. این یافته

جدول ٤ –تعداد فولیکول‌ها و جسم‌های زرد در زاده‌های گروه‌های کنترل و آزمایشی در بزرگسالی (سن ۱۰۰-۹۰ روزگی)

متغیر	گروه	
	کنترل (تعداد = ٥)	آزمایشی (تعداد = ٦)
تعداد فولیکول‌های پره آنترال	۳/۴ ± ۰/۹	۷/۴۰ ±۱/۳
تعداد فولیکول‌های آنترال	۱۰ ± ۲/۶	۱۵/۶ ± ۲/۱
تعداد فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری	۰/۷۲ ± ۰/۲	۰/۵۳ ± ۰/۱۹
تعداد جسم‌های زرد	۱۰/۷ ± ۰/۹	۸/۹ ± ۱/۳

مقایسه دو گروه با آزمون independent-sample student *t*-test انجام شد. مقادیر بر اساس میانگین و خطای استاندارد میانگین می باشند

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]



شکل ۱- بافت تخمدان در زاده های گروه‌های کنترل و آزمایشی در بزرگسالی (سن ۱۰۰-۹۰ روزگی). F: Preantral follicle (فولیکول پره آنترال)، AF: Antral follicle (فولیکول آنترال)، POF: Preovulatory follicle (فولیکول پیش از تخمک گذاری)، CL: Corpus luteum (جسم زرد). بزرگنمایی ×۱۰۰. A: مقطع بافت تخمدان در زاده های گروه کنترل، B: مقطع بافت تخمدان در زاده های گروه آزمایشی. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین.

مطابق با یافته مطالعه قبلی می‌باشد [۸]. افزایش ترشح LH در زاده‌های گروه آزمایشی ممکن است به دو دلیل رخ داده باشد: ۱) افزایش فعالیت مولد پالس GnRH (هورمون رها کننده گنادوتروپین) در هیپوتالاموس (فرکانس بالای پالس GnRH، منجر به ترشح LH می شود) که این می تواند به دنبال در معرض گذاری با آندروژن در دوره پیش از تولد رخ داده باشد. اگرچه مکانیسم دقیق اثرات آندروژن پیش از تولد، بر روی افزایش پالس های GnRH، هنوز به درستی روشن نشده است، اما شاید به دنبال تغییرات در اتصالات و ارتباطات سیناپسی برای نورون های GnRH، یا به علت تغییرات ویژه در تحریک از نورون های رها کننده gamma-amino butyric acid به نورون های GnRH باشد، همانطور که در مطالعات قبلی گزارش شده است [۹]. ۲) کاهش فیدبک منفی استروئیدهای جنسی بر روی ترشح LH. در میمون‌های ماده ای که در طول دوره زندگی پیش از تولد در معرض آندروژن قرار گرفته بودند [۱۰] و همچنین در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک که سطح آندروژن خونشان بالا می‌باشد اثر فیدبک منفی استروئیدهای جنسی کاهش یافته است. اگرچه، این مکانیسم های احتمالی که می توانند باعث افزایش ترشح LH شوند، در مطالعه ما مورد بررسی قرار نگرفته اند.

افزایش غلظت سرمی تستوسترون در زاده‌های گروه آزمایشی، می‌تواند به دنبال افزایش غلظت LH و تأثیر آن بر روی سلول های تکا باشد (سلول های تکا تستوسترون ترشح می کنند) یا ممکن است به علت کمبود یا نقص در فعالیت آنزیم آروماتاز باشد (آنزیم آروماتاز آندروژن را به استروژن تبدیل می کند). افزایش غلظت سرمی LH و تستوسترون در این مطالعه در توافق با یافته گزارش شده در یک مطالعه قبلی می باشد [۴]. اگرچه در یک مطالعه دیگر که بر روی موش های کوچک آزمایشگاهی انجام شده بود، موش هایی که در دوره زندگی پیش از تولد در معرض آندروژن قرار گرفته بودند، در سن ۵ ماهگی علی رغم افزایش سطح LH، سطح تستوسترون افزایش معنی داری نشان نداد [۱۱]. این اختلافی که در بین مطالعات مختلف مشاهده شد، ممکن است به علت اختلاف در نوع حیوان و یا اختلاف در سن حیوان در زمان مطالعه باشد. با توجه به اینکه در حیواناتی که در دوره پیش از تولد در معرض آندروژن بوده اند وضعیت های هورمونی مختلفی گزارش شده است و همچنین در برخی از مطالعات اختلاف درسطح تستوسترون در سنین مختلف گزارش شده است.

در این مطالعه، غلظت سرمی FSH در زاده های گروه آزمایشی در مقایسه با زاده های گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد. در یک مطالعه قبلی نیز موش های صحرایی که در دوره پیش از تولد در معرض آندروژن قرار گرفته بودند تغییراتی را در غلظت FSH پس از بلوغ نشان ندادند [۴].

در مطالعه حاضر، غلظت سرمی استروژن در زاده های گروه آزمایشی در مقایسه با زاده‌های گروه شم به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. کاهش غلظت استروژن شاید به علت کاهش در فعالیت آنزیم آروماتاز باشد. چنانچه فعالیت آنزیم آروماتاز کاهش پیدا کند تبدیل تستوسترون به استروژن مهار می شود که این منجر به کاهش سطح استروژن و از طرفی افزایش

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

غلظت تستوسترون می شود [۱۲]. اگرچه این مورد نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

در مطالعه ما، علی رغم یک روند کاهشی بدون معنی (Non-significant) در تعداد جسم های زرد در تخمدان زاده‌های گروه آزمایشی، در مقایسه با زاده‌های گروه شم، غلظت سرمی پروژسترون بین این دو گروه تفاوت معنی داری نشان نداد. این عدم هماهنگی بین دو یافته شاید به علت اثر غلظت افزایش یافته LH بر روی جسم‌های زرد باشد که از کاهش ترشح پروژسترون جلوگیری کرده است.

در زاده های گروه آزمایشی، یک روند کاهشی بدون معنی (Non-significant) در تعداد جسم‌های زرد مشاهده شد. این روند کاهشی می تواند نشان دهنده یک روند کاهشی در تخمک گذاری در این حیوانات باشد. روند کاهشی تخمک گذاری ممکن است بر اثر فقدان موج های GnRH و LH به دنبال در معرض گذاری با آندروژن در دوره زندگی پیش از تولد رخ داده باشد. در جوندگان ماده، موج GnRH پیش از تخمک گذاری وابسته به قدرت استروژن تخمدانی برای جفت شدن با یک سیگنال عصبی روزانه می باشد [۱۳]. روندی که به نظر می رسد بوسیله قدرت استروئیدها برای القاء کردن بیان گیرنده های پروژسترونی در هسته های قدامی–شکمی اطراف–بطنی (Antero-Ventral Peri-Ventricular)، واسطه‌گری می‌شود [۱۴].

مطالعات قبلی بیان کرده اند که فقدان بیان گیرنده های پروژسترونی، کاهش بیان گیرنده های پروژسترونی در هسته های قدامی–شکمی اطراف–بطنی [۱۵]، یا آنتاگونیست گیرنده های پروژسترونی [۱۶]، موج های GnRH و LH القاء شده توسط استروژن را کاهش می دهند. در معرض گذاری با آندروژن در دوره زندگی پیش از تولد می تواند بیان گیرنده های پروژسترونی در منطقه پره اپتیک را کاهش دهد [۴]، همچنین می تواند منجر به مقاومت دائمی منطقه پره اپتیک به اعمال استروژن برای القاء گیرنده های پروژسترونی شود.

مطالعات انجام شده قبلی بر روی موش های صحرایی [۱۷]، گوسفند [۱۸] و میمون [۱۹] بیان کرده اند که فعال سازی گیرنده های آندروژنی در طول زندگی پیش از تولد می تواند از رهایی موج گنادوتروپین در بزرگسالی جلوگیری کند.

در زاده‌های گروه آزمایشی، غلظت سرمی آنتی مولرین هورمون در مقایسه با زاده های گروه شم به طور معنی داری کاهش پیدا کرده بود. کاهش در سطوح آنتی مولرین هورمون ممکن است به علت کاهش تعداد فولیکول هایی باشد که این هورمون را تولید می کنند، یا می تواند به علت کاهش تکثیر سلول های گرانولوزا (آنتی مولرین هورمون در سلول های گرانولوزا ساخته می شود) به دنبال در معرض گذاری با آندروژن در شرایط پیش از تولد باشد. در یک مطالعه قبلی که بر روی گوسفند انجام شده بود Veiga-Lopez و همکارانش نشان دادند که در معرض گذاری جنین های ماده گوسفند با مقادیر بالایی از آندروژن در دوره زندگی پیش از تولد، بیان آنتی مولرین هورمون را در فولیکول های پره آنترال کاهش و در فولیکول های آنترال افزایش می دهد [۲۰].

نقطه قوت مطالعه حاضر این بود که زمان در معرض‌گذاری جنین‌های ماده با آندروژن (تستوسترون)، همزمان با تولید یک موج آندروژن در جنین های نر موش های صحرایی بوده است (در جنین های نر موش های صحرایی یک موج از آندروژن وجود دارد که از روز ۱۶ جنینی شروع شده و تا روز ۲۱ جنینی ادامه دارد). این دوره از تکامل جنین های ماده، ممکن است که به عنوان یک دوره بحرانی برای در معرض قرار گرفتن با آندروژن باشد. همچنین ما در این مطالعه اثر یک تک دوز با غلظت بالا از تستوسترون را بر روی تکامل و عملکرد سیستم تولیدمثلی ماده بررسی کرده ایم.

نتیجه‌گیری

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که در معرض قرار گرفتن جنین های ماده با تک دوزی از تستوسترون در روز ۲۰ تکامل منجر به بروز برخی از تغییرات تکاملی در سیستم تولیدمثلی خارجی و همچنین بروز تغییراتی در ترشح هورمون ها و بافت تخمدان در طول بزرگسالی می شود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می شود که به منظور بررسی تأثیر دوز آندروژن بر روی بروز اختلالات در سیستم تولیدمثلی ماده و بروز علائمی شبیه به سندرم تخمدان پلی کیستیک، در مطالعات آینده دوزهای دیگری از آندروژن مورد مطالعه قرار گیرند.

سپاسگزاری

از مسئولین پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بدلیل فراهم نمودن شرایط و هزینه های لازم برای انجام این تحقیق و از آقایان دکتر عبداله امینی و دکتر مهدی هدایتی جهت همکاری هایشان در انجام تکنیک های آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می نماییم.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

م.ن: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ف.ر.ت: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه; ا.ز.و: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ع.پ: انجام مطالعه; ف.ع: مشاوره.

فهرست منابع

[1] Ashton N, Perinatal development and adult blood pressure. ***Braz J Med Biol Res*** 33 (2000) 731-740.

[2] Desai M, Hales CN, Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. ***Biol Rev Camb Philos Soc*** 72 (1997) 329-348.

[3] Franks S, Polycystic ovary syndrome. ***N Engl J Med*** 333 (1995) 853-861.

[4] Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, Xiao WF, Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. ***Endocr J*** 57 (2010) 201-209.

[5] Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Duran C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T, Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 289 (2005) E801-806.

[6] Li Z, Huang H, Epigenetic abnormality: a possible mechanism underlying the fetal origin of polycystic ovary syndrome. ***Med Hypotheses*** 70 (2008) 638-642.

[7] Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE, Jr, Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. ***Toxicol Sci*** 65 (2002) 71-86.

[8] Dumesic DA, Abbott DH, Eisner JR, Goy RW, Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood. ***Fertil Steril*** 67 (1997) 155-163.

[9] Sullivan SD, Moenter SM, Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 101 (2004) 7129-7134.

[10] Dumesic DA, Schramm RD, Abbott DH, Early origins of polycystic ovary syndrome. ***Reprod Fertil Dev*** 17 (2005) 349-360.

[11] Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM, Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. ***J Endocrinol*** 207 (2010) 213-223.

[12] Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E, A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. ***Endocrinology*** 148 (2007) 3781-3791.

[13] Chappell PE, Lee J, Levine JE, Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. ***Endocrinology*** 141 (2000) 1486-1492.

[14] Levine JE, New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. ***Biol Reprod*** 56 (1997) 293-302.

[15] Chappell PE, Levine JE, Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. ***Endocrinology*** 141 (2000) 1477-1485.

[16] Bellido C, Gonzalez D, Aguilar R, Sanchez-Criado JE, Antiprogestins RU486 and ZK299 suppress basal and LHRH-stimulated FSH and LH secretion at pituitary level in the rat in an oestrous cycle stage-dependent manner. ***J Endocrinol*** 163 (1999) 79-85.

[17] Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE, Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. ***Biol Reprod*** 72 (2005) 1475-1483.

[18] Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE, Foster DL, Padmanabhan V, Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. ***Biol Reprod*** 66 (2002) 924-933.

[19] Zeleznik AJ, Little-Ihrig L, Ramasawamy S, Administration of dihydrotestosterone to rhesus monkeys inhibits gonadotropin-stimulated ovarian steroidogenesis. ***J Clin Endocrinol Metab*** 89 (2004) 860-866.

[20] Veiga-Lopez A, Ye W, Padmanabhan V, Developmental programming: prenatal testosterone excess disrupts anti-Mullerian hormone expression in preantral and antral follicles. ***Fertil Steril*** 97 (2012) 748-756.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]

Research paper

The effect of intrauterine injection of androgen on reproductive system and hormonal changes in adult female rat's offspring

Mahsa Norooz-zadeh[1], Fahimeh Ramezani Tehrani[1*], Azita Zadeh-Vakili[2], Abbas Piryaei[3], Fereidoun Azizi[4]

1. Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Biology and Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 7 June 2015 Accepted: 16 August 2015

Abstract

Background and aim: Hormonal disturbances in critical periods of fetal development can lead to changes in the physiology or morphology of an organ. The aim of the present study was to examine reproductive system in female rats exposed to a single dose of testosterone in one of their last fetal development days.

Methods: Testosterone (20 mg in 1 ml solvent) was subcutaneously injected to pregnant rats on gestational day 20. Control group received the solvent. Body weights of female offspring were measured at birth, at days of 15, 30, 45 and 60 of age and in adulthood, ano-genital distance (AGD) was determined at days of 6, 30 and 60 of age. Hormones and morphology of reproductive system and ovary tissue were examined in these offspring in adulthood. The comparison of two groups was performed using the Independent-sample student *t*-test.

Results: In the offspring of experimental group, AGD, clitoris length, testosterone and LH concentrations were significantly increased but estradiol and anti-Mullerian hormone concentrations were significantly decreased ($p<0.05$). Moreover, the number of preantral and antral follicles was increased. However, the numbers of preovulatory follicles and *corpora lutea* were decreased but these changes were not significant statistically.

Conclusion: Exposure of female fetuses to a single dose of testosterone on day 20 of development leads to appearance of some developmental changes in external reproductive system and the appearance of disturbance in hormones secretion in adulthood.

Keywords: Female rat, Prenatal life, Reproductive system, Testosterone

Please cite this article as follows:
Noroozzadeh M, Ramezani Tehrani F, Zadeh-Vakili A, Piryaei A, Azizi F, The effect of intrauterine injection of androgen on reproductive system and hormonal changes in adult female rat's offspring. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2017) 71-79.

*Corresponding author e-mail: ramezani@endocrine.ac.ir
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-22]