Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 27, Issue 5
December & January 2024-2025

Research Article

The Effect of Glyphosate on Ovarian Tissue and in Vitro Maturation in Superovulated Mice

Aatefeh Khaki[1], Maryam Baazm[2], Mohamad Bayat[2,*]

[1] Department of Anatomy, Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[2] Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

*** Corresponding author**: Mohamad Bayat, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. Email: dr.mbayat@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.27.5.271

How to Cite this Article:
Khaki A, Baazm M, Bayat M. The Effect of Glyphosate on Ovarian Tissue and in Vitro Maturation in Superovulated Mice. *J Arak Uni Med Sci*. 2025;**27**(5): 271-8. DOI: 10.61186/jams.27.5.271

Received: 05.09.2024
Accepted: 26.10.2024

Keywords:
Glyphosate;
Oovarian tissue;
Oocyte;
In vitro maturation

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Glyphosate is the most popular broad-spectrum herbicide globally due to the growing demand for glyphosate-resistant crops. Glyphosate exhibits harmful properties, including cytotoxicity, neurotoxicity, and reproductive toxicity. This study aimed to investigate the detrimental effects of glyphosate on ovarian histopathology in mice and the in vitro maturation (IVM) of oocytes following superovulation.

Methods: In this study, thirty-two female NMRI mice were randomly divided into the following groups: control, glyphosate, superovulation, and superovulation-glyphosate. Animals received glyphosate (0.5%) continuously through drinking water for three weeks. HMG and HCG were used to induce superovulation. Oocytes were collected from the ampulla, and the quantity and quality of oocytes were analyzed. Then, in vitro maturation (IVM) of oocytes was performed. At the end of the study, ovarian histopathology was analyzed.

Results: Compared to the control group, the glyphosate-treated group exhibited a significant decrease in secondary and Graafian follicles while demonstrating a concomitant increase in atretic follicles ($P < 0.05$). Additionally, the superovulation-glyphosate group showed fewer germinal vesicle breakdown (GVBD) and MII oocytes than the superovulation group. In the superovulation-glyphosate group, there was a notable reduction in GVBD and MII oocytes following in vitro maturation (IVM).

Conclusions: Glyphosate has the potential to damage ovarian tissue and adversely affect IVM and oogenesis.

Copyright *© 2024 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http"//creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) witch permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره ۲۷، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۳

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک

مقاله پژوهشی

بررسی اثر گلیفوسیت بر بافت‌شناسی تخمدان و میزان بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی در موش‌های تحریک تخمک‌گذاری شده

عاطفه خاکی[۱]، مریم باعزم[۲]، محمد بیات[۲*]

[۱] گروه علوم تشریح، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۲] گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

* نویسنده مسئول: محمد بیات، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
ایمیل: dr.mbayat@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.27.5.271

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۵
واژگان کلیدی:
گلیفوسیت؛
بافت تخمدان؛
تخمک؛
موش؛
بلوغ آزمایشگاهی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: گلیفوسیت، یکی از معروف‌ترین علف‌کش‌هایی است که استفاده از آن به دلیل استفاده زیاد از گیاهان زارعی مقاوم به گلیفوسیت رو به افزایش است. این ماده اثرات مخربی مانند اثرات سمی بر بافت عصبی، سلول‌ها و دستگاه تولیدمثل از خود نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمی این ماده بر بافت تخمدان موش‌ها و لقاح آزمایشگاهی تخمک‌ها به دنبال تحریک تخمک‌گذاری بود.

روش کار: در این مطالعه، ۳۲ موش ماده NMRI، به صورت تصادفی به گروههای زیر تقسیم شدند: شاهد، گلیفوسیت، تحریک تخمک‌گذاری، تحریک تخمک‌گذاری-گلیفوسیت. گلیفوسیت (۰/۵ درصد) از طریق اضافه شدن به آب آشامیدنی به مدت سه هفته به حیوانات داده شد. جهت تحریک تخمک‌گذاری حیوانات از هورمون های HMG و HCG استفاده شد. تخمک‌ها از ناحیه آمپول جمع‌آوری شدند و بعد از بررسی کمیت و کیفیت آنها، بلوغ آزمایشگاهی انجام شد. در پایان این مطالعه، هیستوپاتولوژی تخمدان مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که تعداد فولیکول‌های ثانویه و گراف در گروه گلیفوسیت به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود درحالی‌که تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). تعداد تخمک‌ها در مرحله شکست ژرمینال وزیکول و متافاز ۲ در گروه تحریک تخمک‌گذاری- گلیفوسیت در مقایسه با گروه تحریک تخمک‌گذاری کاهش یافت. بعد از بلوغ آزمایشگاهی هم تعداد تخمک‌ها در مرحله شکست ژرمینال وزیکول و متافاز ۲ در گروه تحریک تخمک‌گذاری-گلیفوسیت در مقایسه با گروه تحریک تخمک‌گذاری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: گلیفوسیت منجر به اثرات مخرب بر بافت تخمدان می‌شود. همچنین گلیفوسیت باعث نقص در اووژنز و لقاح آزمایشگاهی می‌شود.

ارجاع: خاکی عاطفه، باعزم مریم، بیات محمد. بررسی اثر گلیفوسیت بر بافت‌شناسی تخمدان و میزان بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی در موش‌های تحریک تخمک‌گذاری شده. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک* ۱۴۰۳؛ ۲۷ (۵): ۲۷۸-۲۷۱.

مقدمه

با پیشرفت صنعت کشاورزی، استفاده از سموم دفع آفات به صورت گسترده‌ای در کشاورزی، باغداری، کاشت و ایجاد جنگل مورد استفاده قرار گرفته است. در میان تمام روش‌های کنترل علف‌های هرز، علفکش‌ها وسیله‌ای مطمئن با کارآیی بالا بوده و به آسانی قابل کاربرد می‌باشند. اما از طرفی استفاده گسترده از این سموم، موجب آلودگی خاک و آب شده که متعاقبا صدمات بالقوه‌ای به محیط زیست و سلامتی انسان وارد می‌کنند (۱). یکی از این علف‌کش‌ها که به طور گسترده‌ای در سراسر دنیا برای کنترل علف‌های هرز در مناطق زراعی و غیر زراعی مورد استفاده قرار می‌گیرد گلیفوسیت با نام تجاری Roundup® و نام شیمیایی N-(phosphonomethyl) glycine است (۲، ۳).

گلیفوسیت پایداری کمی داشته و اثرات زیست‌محیطی آن به حجم و فراوانی کاربرد این ماده بستگی دارد (۳). در سال‌های اخیر به علت افزایش و گسترش گیاهان و محصولات تراریخته‌ای که در برابر گلیفوسیت مقاوم شده‌اند، موضوع سمیت گلیفوسیت بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۱، ۴). با وجود مطالب ذکر شده در مورد بی‌خطر بودن گلیفوسیت، در این زمینه اختلاف نظر وجود دارد. مطالعات، حضور گلیفوسیت را در دانه‌های سویا قبل و بعد از برداشت تأیید کرده‌اند. همچنین این ماده در ادرار خانواده‌های کشاورزان نیز شناسایی شده است (۳).

با توجه به محدودیت پژوهش در این زمینه بر انسان، بیشتر مطالعات صورت گرفته در مورد گلیفوسیت در محیط‌های درون‌تنی و برون‌تنی، بر روی نمونه‌های حیوانی بوده است. همچنین تعداد این مطالعات محدود

Copyright *© 2024 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http"//creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) witch permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

بوده و گاهاً اختلاف در نتایج به دلیل استفاده از گونه‌های مختلف، دوز و زمان‌های متفاوت گلیفوسیت وجود دارد. اما به طور کلی نتایج نشان می‌دهند که گلیفوسیت اثر منفی بر سیستم اندوکرین دارد. این ماده می تواند تنظیم محورهای هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- کلیوی، هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- تیروئیدی (۵) و تعادل استروژن/ آندروژن را به هم بزند (۶). تماس رت‌های نر با گلیفوسیت در ابتدای بلوغ منجر به نازک شدن اپی‌تلیوم لوله‌های سمی نفروس و افزایش قطر این لوله‌ها می‌شود. تغییر در میزان هورمون‌های جنسی متعاقباً منجر به تغییر در تعداد و عملکرد سلول‌های لیدیگ و تغییر در میزان و فعالیت آروماتاز می‌شود (۱).

همچنین کاهش در تعداد اسپرم‌ها، کاهش سطح تستوسترون و به هم خوردن تعادل آنتی‌اکسیدانی از اثرات دیگر تماس با گلیفوسیت است (۷). در رت‌های ماده گلیفوسیت بر استروئیدوژنز در تخمدان اثر داشته و تماس طولانی‌مدت با آن موجب کاهش میزان استروژن در تخمدان می‌شود (۸). در موش‌های ماده تغییرات هورمونی، افزایش استرس اکسیداتیو و تغییر در فولیکولوژنز مثل افزایش فولیکول‌های آترتیک به دنبال تماس با گلیفوسیت گزارش شده است (۹). در همین رابطه مطالعات نشان دادند که دریافت طولانی‌مدت گلیفوسیت در موش‌های C57Bl6 موجب افزایش فولیکول‌های اولیه، ثانویه و آنترال می‌شود (۵). همچنین تماس رت‌ها در دوران نوزادی با گلیفوسیت منجر به افزایش هایپرپلازی رحم، افزایش گیرنده‌های استروژنی آلفا و پروژسترونی P4 می‌شود (۱۰). به نظر می‌رسد تماس طولانی‌مدت با دوز کم گلیفوسیت منجر به تغییر در پروتئوم تخمدان و تغییر در عملکرد آن می‌شود (۱۱). تماس مستقیم تخمک موش‌ها با گلیفوسیت منجر به تخریب دوک تقسیم، اختلال در نحوه قرارگیری کروموزوم‌ها و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شده (۱۲) اما بر بلوغ هسته و کیلواژ جنین خوک اثری ندارد. هر چند که باعث تأخیر در تکامل تخمک‌های خوک می‌شود (۶). تجویز این ماده در دوران بارداری موش‌ها، تعداد فولیکول‌های بالغ را کاهش و فولیکول‌های آترتیک را افزایش می‌دهد (۹). با توجه به اینکه مشخص شده تماس مستقیم تخمک‌ها با گلیفوسیت در محیط آزمایشگاهی منجر به کاهش شکست ژرمینال وزیکول GVBD (Germinal vesicle breakdown) و همچنین خروج اولین جسم قطبی PBE (Polar body extrusion) می‌شود (۱)، اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تغییر در بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌ها IVM (in vitro maturation) متعاقب تماس حیوان با گلیفوسیت گزارش نشده است. از این‌رو هدف از این مطالعه، بررسی بافت‌شناسی تخمدان، کیفیت و تعداد اووسیت‌ها به دنبال IVM، در موش‌هایی که در معرض گلیفوسیت قرار گرفتند می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه آزمایشگاهی از ۳۲ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI با وزن ۳۰-۲۵ گرم (پاستور، ایران) استفاده شد. حیوانات در دمای اتاق ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد، چرخه استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به منابع آب و غذا نگهداری شدند. در تمامی مراحل کار، دستورالعمل اخلاق کار با حیوانات مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک مورد توجه قرار گرفت (کد اخلاق IR.AUMS.REC 1399.153).

طراحی مطالعه: در این مطالعه موش‌ها به صورت تصادفی در۴ گروه ۸تایی قرار گرفتند: شاهد (Con)، دریافت‌کننده گلایفوسیت (GF)، دریافت‌کننده گلایفوسیت+ تحریک تخمک‌گذاری (SO&GF) و گروه تحریک تخمک‌گذاری (SO). گلیفوسیت (Merck، آلمان) به مدت ۳ هفته و به میزان ۰/۵ درصد به آب آشامیدنی حیوانات اضافه شد (۹). در پایان، تخمدان موش‌ها در کلیه گروه‌ها خارج و پس از توزین جهت انجام مطالعات بافت‌شناسی به فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد. در گروه‌های تحریک تخمک‌گذاری، بعد از این مدت طبق پروتوکل، تحریک تخمک‌گذاری با هورمون‌های مربوطه انجام شد. سپس تخمک‌ها از ناحیه آمپول جدا و پس از بررسی کیفیت و تعداد، جهت انجام بلوغ آزمایشگاهی به محیط کشت IVM منتقل شدند.

تحریک تخمک‌گذاری: تحریک تخمک‌گذاری، یک‌بار در حیوانات صورت گرفت. به این منظور، موش‌ها ابتدا هورمون (Pregnant mare serum gonadotropin) PMSG (Gibco، آمریکا) را به میزان ۷/۵ واحد و پس از ۴۸ ساعت هورمون (Human chorionic gonadotropin) HCG (Gibco، آمریکا) به میزان ۱۰ واحد را به روش داخل صفاقی دریافت کردند. ۱۲ ساعت پس از تزریق HCG حیوانات به روش آسان‌کشی کشته شدند. پس از باز کردن حفره شکم، تخمدان از بافت‌های اطراف جدا و جهت بررسی‌های بافت‌شناسی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، به فرمالین ده درصد منتقل شد. جهت جداسازی تخمک‌های آزاد شده و بررسی آنها، لوله رحم از شاخ رحم جدا شد و به قطره حاوی محیط کشت منتقل گردید.

لقاح درون آزمایشگاهی: جهت انجام لقاح درون آزمایشگاهی، با استفاده از استریومیکروسکوپ آمپول لوله رحم مشخص شد و با استفاده از پنس‌های ظریف دیواره آمپول باز و تخمک‌ها آزاد شدند. تخمک‌های آزاد شده با استفاده از پیپیت دهانی به محیط M2 (Betacell، ایران) که قبلاً در پتری دیش قطره‌گذاری و توسط روغن معدنی پوشیده شده بود منتقل شدند. در این مرحله تعداد تخمک‌های دژنره، ژرمینال وزیکول (Germinal vesicle) GV، GVBD و PBE بررسی شدند. سپس تخمک‌های نابالغ (GV) و بالغ (GVBD) به محیط IVM منتقل شدند و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در پایان تعداد تخمک‌های GVBD و MII شمارش شدند. محیط IVM شامل: MEMα حاوی ۱۰۰ میلی واحد در میلی‌لیتر FSH، ۷/۵ واحد در میلی‌لیتر HCG و ۱۰ درصد FBS بود (۱).

بررسی بافت‌شناسی تخمدان: بعد از فیکس کردن تخمدان و انجام مراحل آب‌گیری با الکل و شفاف‌سازی با گزیلل، قالب‌های پارافینی از نمونه‌ها تهیه و برش‌های ۵ میکرومتری زده شد. بعد از انجام مراحل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و چسباندن لامل، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر مقطع (۲۰ ناحیه میکروسکوپی)، تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آترتیک و گراف شمارش شد. اندازه هر یک از فولیکول‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸

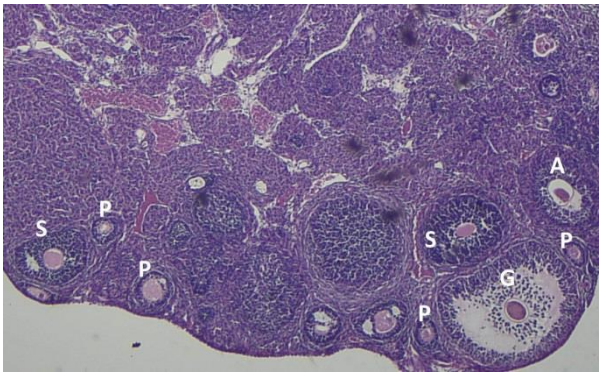
version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. جهت بررسی آماری، ابتدا توزیع طبیعی بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk مورد تأیید قرار گرفت. سپس از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) جهت بررسی تفاوت بین میانگین گروه‌های موردمطالعه استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن آنالیز تحلیل یک‌طرفه از آزمون تعقیبی Tuky جهت پیدا کردن اختلاف استفاده شد. مقادیر به‌دست آمده با $P < ۰/۰۵$، از نظر آماری معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن تخمدان: نتایج مطالعه ما نشان داد که بین میانگین وزن تخمدان در گروه شاهد (۰/۱۹ ± ۱/۵۸) و گروه‌های مورد آزمایش گلیفوسیت (۳۷/۲۵ ± ۱/۰)، تحریک تخمک‌گذاری (۰/۲۳ ± ۱/۲۶) و تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت (۰/۱۵ ± ۱/۲۶) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$).

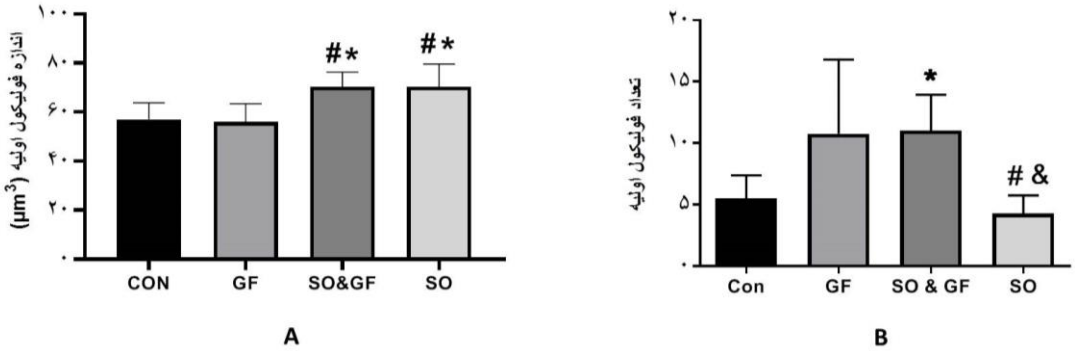
تعداد و اندازه فولیکول‌های اولیه: فولیکول‌های اولیه در کلیه مقاطع بافتی مورد بررسی قرار گرفتند. این فولیکول‌ها با حضور یک یا دو ردیف سلول گرانولوزای مکعبی شکل مشخص می‌شوند (۱۳) (شکل ۱). نتایج نشان داد که بین اندازه فولیکول‌های اولیه در گروه‌های CON و GF تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$). اما اندازه فولیکول‌های اولیه در گروه‌های SO و SO&GF در مقایسه با گروه‌های GF و CON افزایش معنی‌داری داشت. همچنین بین تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه‌های CON و GF تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه SO&GF در مقایسه با گروه‌های GF و CON افزایش معنی‌داری داشت در حالی که در گروه SO تعداد فولیکول‌های اولیه کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۲).

تعداد و اندازه فولیکول‌های ثانویه: فولیکول‌های ثانویه که با حضور چندین لایه سلول گرانولوزا در اطراف تخمک مشخص می‌شوند (۱۴) در مقاطع بافتی شمارش شدند (شکل ۱). بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که اندازه فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های مورد مطالعه تغییری پیدا نکرد. اما تعداد آنها در گروه GF در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. در گروه SO تعداد فولیکول‌های ثانویه نسبت به گروه‌های GF و SO&GF افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه SO&GF نیز مشاهده شد اما در مقایسه با گروه GF به صورت معنی‌داری نبود (شکل ۳).

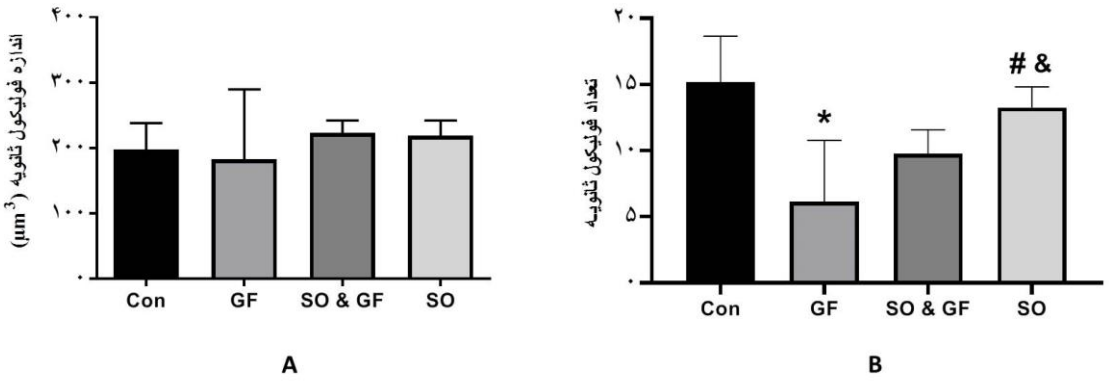


شکل ۱. تصویر بافت‌شناسی تخمدان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. در این شکل فولیکول‌های اولیه (P) با حضور یک یا دو ردیف سلول گرانولوزای مکعبی، فولیکول‌های ثانویه (S) با چندین لایه سلول گرانولوزا در اطراف تخمک، فولیکول‌های آترتیک (A) با از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌های گرانولوزا واتصال سست بین آنها و فولیکول‌های گراف (G) با حضور تخمک که توسط چندین لایه سلول گرانولوزا در برگرفته شده و در بین آنها یک فضای حاوی مایع وجود دارد قابل تشخیص هستند. بزرگنمایی X ۱۰.

تعداد و اندازه فولیکول‌های آترتیک: مقاطع بافت‌شناسی از نظر حضور فولیکول‌های آترتیک بررسی شدند. این فولیکول‌ها با از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌های گرانولوزا واتصال سست بین آنها، همچنین تمایز سلول‌های تکا و از بین رفتن سلول‌های فولیکول مشخص می‌شوند (۱۵) (شکل ۱). در گروه SO&GF اندازه فولیکول‌های آترتیک افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. در حالیکه به دنبال تحریک تخمک‌گذاری اندازه فولیکول‌ها در مقایسه با گروه SO&GF کاهش معنی‌داری داشت. نتایج حاصل از شمارش نشان داد که به دنبال مصرف گلیفوسیت تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش می‌یابد هر چند که این افزایش معنی‌دار نبود. اما تحریک تخمک‌گذاری موجب کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های آترتیک در مقایسه با گروه SO&GF شد (شکل ۴).



شکل ۲. بررسی اندازه (A) و تعداد (B) فولیکول‌های اولیه در گروه‌های مختلف، Con : گروه شاهد، GF: گروه گلیفوسیت، SO & GF: گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO : گروه تحریک تخمک‌گذاری. ⁕: وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد ، # : وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت، &: وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت و تحریک تخمک‌گذاری. مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین ± میانگین بیان شده است.

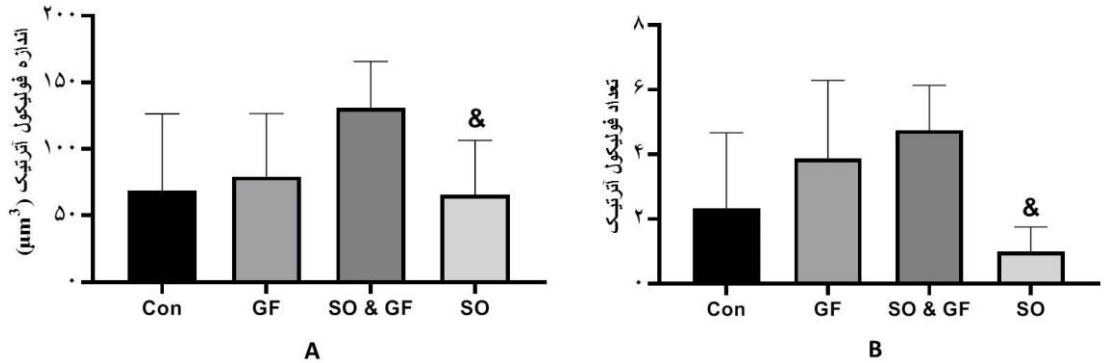


شکل ۳. بررسی اندازه (A) و تعداد (B) فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های مختلف، Con : گروه شاهد، GF: گروه گلیفوسیت، SO & GF : گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO : گروه تحریک تخمک‌گذاری. *: وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد، # : وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت، &: وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت و تحریک تخمک‌گذاری. مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین ± میانگین بیان شده است.

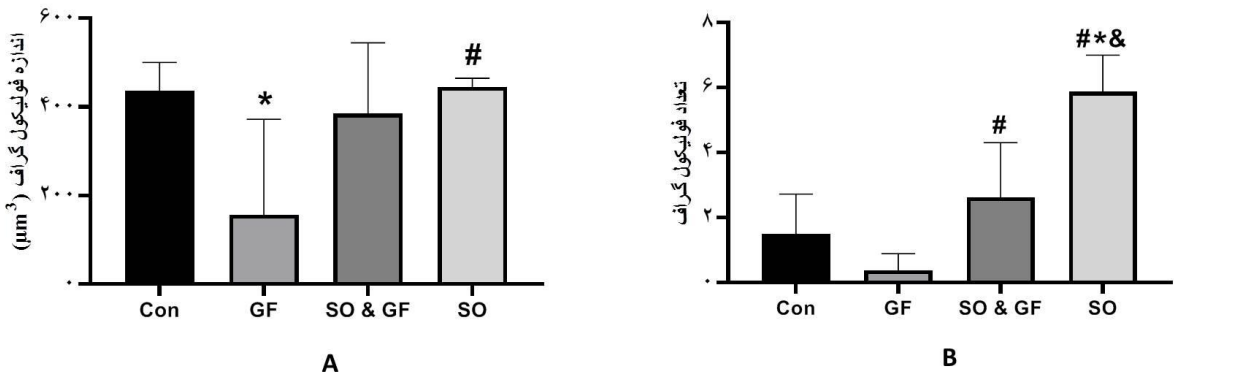
تعداد و اندازه فولیکول‌های گراف: فولیکول‌های گراف در تمام گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این فولیکول‌ها با حضور تخمک که توسط چندین لایه سلول گرانولوزا در برگرفته شده و در بین آنها یک فضای حاوی مایع وجود دارد مشخص می‌شود (۱۶) (شکل ۱). بررسی‌ها نشان داد اندازه فولیکول‌های گراف به دنبال مصرف گلیفوسیت کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد می‌یابد و انجام تحریک تخمک‌گذاری منجر به افزایش اندازه این فولیکول‌ها شده، به نحوی که در گروه SO اندازه فولیکول‌های گراف افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه گلیفوسیت داشت. از نظر تعداد فولیکول‌های گراف، گلیفوسیت موجب کاهش تعداد این فولیکول‌ها شد هر چند که این کاهش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. به دنبال تحریک تخمک‌گذاری تعداد این فولیکول‌ها در هر دو گروه SO و SO&G افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده گلیفوسیت داشت. تحریک تخمک‌گذاری به تنهایی موجب افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های گراف در مقایسه با گروه شاهد و SO&GF شد (شکل ۵).

تعداد و کیفیت تخمک‌ها قبل از IVM: بعد از جمع‌آوری تخمک‌ها از آمپول لوله رحم موش‌های گروه‌های SO و SO&GF، ابتدا کیفیت تخمک‌های به دست آمده بررسی و به تخمک‌های دژنره، تخمک‌های بدون تغییر شکل در هسته (GV) یا نارس، تخمک‌های با غشای هسته شکسته شده (GVBD) یا نسبتاً بالغ و و تخمک‌های دارای جسم قطبی (MII) یا بالغ طبقه‌بندی شدند (شکل ۶) و تعداد هر کدام محاسبه شد. ۱۶۸ تخمک از گروه گلایفوسیت و تحریک تخمک‌گذاری و ۲۰۰ تخمک از گروه تحریک تخمک‌گذاری جمع‌آوری شد. تعداد تخمک‌های MII (۶/۵ درصد در مقایسه با ۲/۳ درصد) و GVBD (۵۶/۵ درصد در مقایسه با ۳۲/۵ درصد) در گروه SO بیشتر از گروه SO&GF بود. در حالی که تخمک‌های GV (۳۴/۷ درصد در مقابل ۵۳/۴ درصد) و دژنره (۲/۳ درصد در مقایسه با ۱۱/۸ درصد) در گروه SO&GF بیشتر از گروه SO بود (جدول ۱).

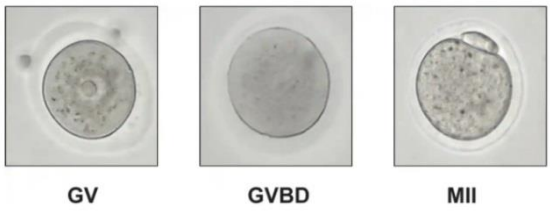
تعداد و کیفیت تخمک‌ها بعد از IVM: تخمک‌های نابالغ و بالغ مربوط به گروه‌های SO و GF&SO به مدت ۱۲ ساعت در محیط IVM قرار گرفتند. بعد از ۱۲ ساعت میزان بلوغ تخمک‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد تعداد تخمک‌های MII (۱۹/۵ درصد در مقایسه با ۱۳/۹ درصد) و GVBD (۶۳ درصد در مقایسه با ۴۴/۱ درصد) در گروه SO بیشتر از گروه SO&GF است. در حالی که تخمک‌های GV (۱۵/۲ درصد در مقابل ۲۳/۲ درصد) و دژنره (۲ درصد در مقایسه با ۱۸/۸ درصد) در گروه SO&GF بیشتر از گروه SO بود (جدول ۲).



شکل ۴. بررسی اندازه (A) و تعداد (B) فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های مختلف، Con : گروه شاهد، GF: گروه گلیفوسیت، SO & GF: گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO: گروه تحریک تخمک‌گذاری. **&**: وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت و تحریک تخمک‌گذاری. مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین ± میانگین بیان شده است.



شکل ۵. بررسی اندازه (A) و تعداد (B) فولیکول‌های گراف در گروه‌های مختلف، Con : گروه شاهد، GF: گروه گلیفوسیت، SO & GF: گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO: گروه تحریک تخمک‌گذاری. * : وجود تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد، # : وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت، &: وجود تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه گلیفوسیت و تحریک تخمک‌گذاری. مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین ± میانگین بیان شده است.



شکل ۶. کیفیت تخمک‌های به دست آمده به دنبال تحریک تخمک‌گذاری و IVM نشان داده شده است. GV: تخمک نابالغ، GVBD: تخمک نسبتاً بالغ، MII: تخمک بالغ

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که گلیفوسیت، اثر مخرب بر بافت تخمدان داشته و باعث تغییر در تعداد فولیکول‌های بافت تخمدان می‌شود. استفاده از گلیفوسیت باعث کاهش کیفیت تخمک‌های آزاد شده در لوله رحم و همچنین کاهش میزان بلوغ آزمایشگاهی شد. عملکرد صحیح تخمدان برای باروری و سلامت زنان بسیار مهم است. مطالعات مختلف نشان داده است که شاخص باروری زنان تا حد زیادی می‌تواند تحت تأثیر برخی آفت‌کش‌ها قرار بگیرد. تأثیر آفت‌کش‌ها بر عملکرد تخمدان از اثرات گذرا (تغییر چرخه و تخمک‌گذاری) تا اثرات دائمی (تخلیه کامل ساختارهای فولیکولی تخمدان) متغیر است (۱۷، ۱۸).

جدول ۱. کیفیت و تعداد تخمک‌ها قبل از IVM

گروه	تخمک‌های دژنره (درصد)	تخمک‌های نابالغ (GV) (درصد)	تخمک‌های نسبتاً بالغ (GVBD) (درصد)	تخمک‌های متافاز ۲ (MII) (درصد)
SO	۲/۳	۳۴/۷	۵۶/۵	۶/۵
SO&GF	۱۱/۸	۵۳/۴	۳۲/۵	۲/۳

SO & GF : گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO: گروه تحریک تخمک‌گذاری

گلیفوسیت، یک علف‌کش غیرانتخابی پرکاربرد است که با فرمولاسیون‌های مختلف می‌تواند تخمدان را هدف قرار دهد (۱۹). یک مطالعه کوهورت، همبستگی معنی‌داری را بین قرار گرفتن مادر در معرض گلیفوسیت و زایمان زودرس نشان داد (۲۰). آزمایشات حیوانی، از دست دادن جنین و نقایص مادرزادی ناشی از قرار گرفتن در معرض گلیفوسیت را نشان می‌دهند. این اثرات نامطلوب تا حد زیادی با اختلال عملکرد تخمدان همراه بوده، که یک موضوع نگران کننده در باروری محسوب می‌شود (۵، ۲۱).

جدول ۲. کیفیت و تعداد تخمک‌ها بعد از IVM

گروه	تخمک‌های دژنره (درصد)	تخمک‌های نابالغ (GV) (درصد)	تخمک‌های نسبتاً بالغ (GVBD) (درصد)	تخمک‌های متافاز ۲ (MII) (درصد)
SO	۲	۱۵/۲	۶۳	۱۹/۵
SO&GF	۱۸/۸	۲۳/۲	۴۴/۱	۱۳/۹

SO & GF: گروه تحریک تخمک‌گذاری و گلیفوسیت، SO : گروه تحریک تخمک‌گذاری.

در همین راستا مطالعه ما نشان داد گلیفوسیت منجر به افزایش فولیکول‌های اولیه و کاهش تعداد فولیکول‌های ثانویه می‌شود هر چند بر روی اندازه آنها تأثیر خاصی نشان نداد. انجام تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های دریافت‌کننده گلیفوسیت نیز همانطور که انتظار می‌رفت موجب افزایش در تعداد فولیکول‌ها، بویژه فولیکول اولیه شد اما این تغییرات به اندازه گروه تخمک‌گذاری نبود. مطالعه Ren و همکاران، مشاهده کردند که در معرض قرار گرفتن موش‌های باردار با گلیفوسیت خوراکی ۰/۰۵ درصد به مدت ۱۹ روز موجب تغییرات هیستوپاتولوژیکی در تخمدان شامل افزایش فولیکول‌های آترتیک، افزایش بافت بینابینی و کاهش تعداد فولیکول‌های بالغ شد. کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل سرمی و افزایش سطوح سرمی مالون دی‌آلدئید نیز از به دنبال استفاده از گلیفوسیت شد. همچنین مطالعه آنها نشان داد تجویز گلیفوسیت به موش‌های باردار با کاهش غلظت سرمی هورمون پروژسترون افزایش استروژن همراه بوده و باعث تغییر بیان ژن‌های GnRH، FSHR، 3b-HSD، LHR و Cyp19a1 در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز-تخمدان می‌شود (۹). در

داخل تخمدان، سیگنال‌دهی بین سلول‌های گرانولوزا و تکا برای حمایت از رشد فولیکول، رشد تخمک و تخمک‌گذاری ضروری است. علاوه بر این، فولیکول تخمدان را می‌توان یک ریز محیط بسیار شکننده در نظر گرفت که در آن چندین تعامل بین هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، تخمک و سلول‌های سوماتیک اطراف آن برای تولید یک تخمک کاملاً ایده‌آل ضروری است. اختلال در این تعادل دقیق می‌تواند منجر به فولیکول‌های چند تخمکی، فعال شدن فولیکول‌ها با افزایش آترزی یا عدم تخمک‌گذاری شود (۲۱-۲۳). در خصوص تغییر در سطح هورمون‌ها بیشترین اثرات ذکر شده در مورد گلیفوسیت شامل: تغییر در بیوسنتز استروژن، تغییر در بیان گیرنده استروژن و تغییر در مسیرهای پیام‌رسانی و یا وقایع سلولی مرتبط با فعالیت استروژن است. با توجه به اهمیت استروژن در فولیکولوژنز و رشد فولیکول‌ها، هر گونه تغییر در سطح این هورمون می‌تواند منجر به اختلال در رشد و تکامل فولیکول‌ها شود (۱۸). هر چند در خصوص کاهش یا افزایش سطح هورمون استروژن توسط گلیفوسیت اختلاف نظر وجود دارد. این مسأله می‌تواند به نوع و یا غلظت گلیفوسیت استفاده شده و نوع حیوان مرتبط باشد. اما همه مطالعات در خصوص تغییر در سطح هورمون‌ها و اختلال در روند استروئیدوژنز توسط گلیفوسیت که متعاقباً منجر به اختلال در عملکرد تخمدان می‌شوند توافق نظر دارند (۲۱، ۲۴).

افزایش آترزی فولیکول‌های تخمدانی با کاهش بیان ژن گیرنده FSH همراه است و همین مسأله باعث کاهش فولیکول‌های بالغ می‌شود (۹). از این‌رو افزایش مشاهده شده در تعداد فولیکول‌های اولیه و کاهش فولیکول‌های ثانویه در مطالعه حاضر می‌تواند مربوط به این تغییرات هورمونی باشد.

Ingaramo و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های ماده در معرض Roundup® در روزهای اول بارداری انجام دادند، تخمدان‌هایی با وزن کمتر و کاهش تعداد اجسام زرد را مشاهده کردند (۲۳). نتایج مشابهی توسط Hamdaoui و همکاران در موش‌های ماده در معرض ترکیبات مشتق از گلیفوسیت مشاهده شد که نشان‌دهنده اختلال در فولیکولوژنز، تغییر رشد تخمدان، کاهش ترشح استروژن، استرس اکسیداتیو و تغییر مورفولوژی تخمدان است (۲۵).

مطالعه ما نشان داد به دنبال تحریک تخمک‌گذاری درحیواناتی که در معرض گلیفوسیت بودند، تعداد فولیکول‌های GVBD و MII کمتر از حیواناتی بود که فقط تحریک تخمک‌گذاری شده بودند. همچنین میزان بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های نابالغ و بالغ حاصل از حیوانات دریافت‌کننده گلیفوسیت به سمت GVBD و MII کمتر از حیواناتی بود که فقط تحریک تخمک‌گذاری شده بودند. از این‌رو به نظر می‌رسد حتی تخمک‌هایی که به نظر بالغ و یا نابالغ می‌رسیدند توانایی بلوغ کامل و رسیدن به مرحله MII را به دلیل اثر گلیفوسیت نداشتند. این مسأله در خصوص استفاده از روش‌های کمک باروری برای افرادی که در معرض گلیفوسیت قرار داشتند می‌تواند نگران‌کننده باشد.

Zhang و همکاران نشان دادند که بلوغ تخمک‌های موش به تخمک GVBD و MII پس از تماس مستقیم با ۵۰۰ میلی‌مول گلیفوسیت کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد گلیفوسیت می‌تواند با تولید رادیکال‌های آزاد، القای آپوپتوز اولیه، تولید دوک تقسیم غیرطبیعی، تغییر در عملکرد میتوکندری تخمک و تخریب DNA تخمک، در بلوغ تخمک موش تداخل ایجاد کند (۱).

همچنین گلیفوسیت با کاهش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD1، SOD2، SIRT2 و SIRT4 ، افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی مثل کاسپاز-۳ و ۴ و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، باعث کاهش کیفیت تخمک‌ها می‌شود (۲۶). تماس رت‌های باردار با گلیفوسیت از روز ۹ بارداری تا پایان آن منجر به کاهش لانه گزینی، تولد تعویق در رشد نوزادان و به دنیا آمدن نوزادانی با نقایص مادرزادی شد که همه این موارد نشان‌دهنده اختلال در بلوغ و تکامل تخمک به دنبال تماس با گلیفوسیت است (۲۱). مطالعات جدید استفاده از موادی مانند ویتامین E را جهت کاهش عوارض ناشی از گلیفوسیت بر بافت تخمدان توصیه می‌کنند (۲۴). با توجه به اینکه طبق بررسی‌های ما این مطالعه اولین بررسی توانایی بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های حاصل از تحریک تخمک‌گذاری حیوانات دریافت‌کننده گلیفوسیت است، اما مطالعات بیشتری در خصوص توانایی لقاح این تخمک‌ها و استفاده از آنها جهت لقاح درون آزمایشگاهی می‌تواند نتایج جالب توجهی داشته باشد. با توجه به موارد ذکر شده و تاثیر گلیفوسیت بر روند باروری، لزوم مطالعات بیشتر در خصوص تماس طولانی‌مدت با گلیفوسیت و همچنین بررسی افرادی که تماس مستقیم با این ماده دارند ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، علف‌کش گلیفوسیت می‌تواند باعث تغییر در بافت تخمدان شده و همچنین بلوغ تخمک‌ها را در بدن حیوان و محیط آزمایشگاه به تأخیر بیندازد. از این‌رو با توجه به اثرات مضر این ماده بر باروری بهتر است در خصوص استفاده از این ماده در کشاورزی دقت بیشتری به عمل آید.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بر اساس پایان‌نامه کارشناسی ارشد به شماره (۶۱۶۶) مورد تأیید معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. از همه کسانی که ما را در این راه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

سهم نویسندگان

محمد بیات (طراحی، نظارت، راه‌اندازی روش کار، ویرایش نهایی مقاله)، مریم باعزم (راه‌اندازی روش کار، تجزیه و تحلیل داده‌ها)، عاطفه خاکی (انجام کارهای آزمایشگاهی، نوشتن پیش‌نویس اصلی مقاله).

تضاد منافع

نویسندگان مقاله حاضر هیچگونه تعارض منافعی نداشته‌اند.

References

1. Zhang J-W, Xu D-Q, Feng X-Z. The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. Chemosphere. 2019;237:124435. **pmid:** 31352102 **doi:** 10.1016/j.chemosphere.2019.124435
2. Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Manag Sci. 2008;64(4):319-25. **pmid:** 18273882 **doi:** 10.1002/ps.1518
3. Schimpf MG, Milesi MM, Ingaramo PI, Luque EH, Varayoud J. Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. Toxicology. 2017;376:2-14. **pmid:** 27287056 **doi:** 10.1016/j.tox.2016.06.004
4. Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA. Glyphosate poisoning. Toxicol Rev. 2004;23(3):159-67. **pmid:** 15862083 **doi:** 10.2165/00139709-200423030-00003
5. Serra L, Estienne A, Vasseur C, Froment P, Dupont J. Mechanisms of glyphosate and glyphosate-based herbicides action in female and male fertility in humans and animal models. Cells. 2021;10(11):3079. **pmid:** 34831302 **doi:** 10.3390/cells10113079
6. Spinaci M, Nerozzi C, Tamanini Cl, Bucci D, Galeati G. Glyphosate and its formulation Roundup impair pig oocyte maturation. *Sci Rep*. 2020;10(1):12007. **doi:** 10.1038/s41598-020-68813-6
7. Romano RM, Romano MA, Bernardi MM, Furtado PV, Oliveira CA. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Arch Toxicol. 2010;84(4):309-17. **pmid:** 20012598 **doi:** 10.1007/s00204-009-0494-z
8. Hamdaoui L, Naifar M, Rahmouni F, Harrabi B, Ayadi F, Sahnoun Z, et al. Subchronic exposure to kalach 360 SL-induced endocrine disruption and ovary. damage in female rats. Arch Physiol Biochem. 2018;124(1):27-34. **pmid:** 28708416 **doi:** 10.1080/13813455.2017.1352606
9. Ren X, Li R, Liu J, Huang K, Wu S, Li Y, et al. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. Environ Pollut. 2018; 243(Pt B):833-41. **pmid:** 30245445 doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.049
10. Ingaramo PI, Schimpf MG, Milesi MM, Luque EH, Varayoud J. Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. Food Chem Toxicol. 2019;134:110832. **pmid:** 31550491 **doi:** 10.1016/j.fct.2019.110832
11. Ganesan S, Keating AF. Ovarian mitochondrial and oxidative stress proteins are altered by glyphosate exposure in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2020;402:115116. **pmid:** 32634520 **doi:** 10.1016/j.taap.2020.115116
12. Yahfoufi ZA, Bai D, Khan SN, Chatzicharalampous C, Kohan-Ghadr H-R, Morris RT, et al. Glyphosate induces metaphase II oocyte deterioration and embryo damage by zinc depletion and overproduction of reactive oxygen species. Toxicology. 2020;439:152466. **pmid:** 32315717 **doi:** 10.1016/j.tox.2020.152466
13. Williams CJ, Erickson GF, Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, et al. Morphology and Physiology of the Ovary. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. **pmid:** 25905186
14. Linher K, Dyce P, Li J. Characterization of primordial germ cell-like cells derived from porcine skin stem cells PLoS One. 2009;4(12):e8263. **pmid:** 20011593 **doi:** 10.1371/journal.pone.0008263
15. Mahmoud AA, Elfiky AM, Abo-Zeid FS. The anti-androgenic effect of quercetin on hyperandrogenism and ovarian dysfunction induced in a dehydroepiandrosterone rat model of polycystic ovary syndrome. Steroids. 2022;177:108936. **pmid:** 34752810 **doi:** 10.1016/j.steroids.2021.108936
16. Lewis NB. New developments in female contraception: an immunocontraceptive vaginal film.[Thesis]. Boston, MA: Boston University; 2024.
17. Williams AL, Watson RE, DeSesso JM. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2012;15(1):39-96. **pmid:** 22202229 **doi:** 10.1080/10937404.2012.632361
18. Milesi MM, Lorenz V, Durando M, Rossetti MF, Varayoud J. Glyphosate herbicide: reproductive outcomes and multigenerational effects. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:672532. **pmid:** 34305812 **doi:** 10.3389/fendo.2021.672532
19. Mohammadi K, Sani MA, Safaei P, Rahmani J, Molaee-Aghaee E, Jafari SM. A systematic review and meta-analysis of the impacts of glyphosate on the reproductive hormones. Environ Sci Pollut Res Int. 2022;29(41):62030-41. **pmid:** 34453247 **doi:** 10.1007/s11356-021-16145-x
20. Parvez S, Gerona R, Proctor C, Friesen M, Ashby J, Reiter J, et al. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. Environ Health. 2018;17(1):23. **pmid:** 29519238 **doi:** 10.1186/s12940-018-0367-0
21. Milesi MM, Lorenz V, Pacini G, Repetti MR, Demonte LD, Varayoud J, et al. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. Arch Toxicol. 2018;92(8):2629-43. **pmid:** 29947892 **doi:** 10.1007/s00204-018-2236-6
22. Kaboli Kafshgiri S, Farkhondeh T, Miri-Moghaddam E. Glyphosate effects on the female reproductive systems: a systematic review. Rev Environ Health. 2022;37(4):487-500. **pmid:** 34265884 **doi:** 10.1515/reveh-2021-0029
23. Ingaramo P, Alarcón R, Munoz-de-Toro M, Luque EH. Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? Mol Cell Endocrinol. 2020;518:110934. **pmid:** 32659439 **doi:** 10.1016/j.mce.2020.110934
24. Shafiee Mehr M, Haeri SMJ, Barzroodi Pour M, Bayat M. Vitamin E improves oxidative stress, apoptosis, and steroidogenesis impairment in glyphosate-induced mice. Drug Chem Toxicol. 2024:1-9. **pmid:** 39478355 **doi:** 10.1080/01480545.2024.2417954
25. Hamdaoui L, Oudadesse H, Lefeuvre B, Mahmoud A, Naifer M, Badraoui R, et al. Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL, Glyphosate-based Herbicide, induced bone rarefaction in female Wistar rats. Toxicology. 2020;436:152412. **pmid:** 32145347 **doi:** 10.1016/j.tox.2020.152412
26. Zhiqiang E, Zhao Y, Sun J, Zhang X, Jin Q, Gao Q. Glyphosate decreases bovine oocyte quality by inducing oxidative stress and apoptosis. Zygote. 2022;30(5):704-11. **pmid:** 35677960 **doi:** 10.1017/S0967199422000181