

مقاله پژوهشی

تأثیر میزان دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات خوراکی بر پاسخ گلاسیمی در موش سوری

بهزاد نجمی کرگان^{*}، علی کارگری رضاپور^۲، رسول شریفی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲- گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۱۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: انسان روزانه در معرض دی اتیل هگزیل فتالات قرار می‌گیرد که ممکن است به بیماری‌های همه‌گیر افزایش چاقی و دیابت نوع ۲ منجر شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر سطوح کمینه و بیشینه دی اتیل هگزیل فتالات خوراکی بر پاسخ گلاسیمی در موش سوری است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۱۵ سر موش سوری نر بالغ، به‌طور تصادفی در ۳ گروه برابر شامل گروه‌های: شاهد سالم، مداخله با فتالات دوز ۲۵۰ mg/kg/bw/day و مداخله با فتالات دوز ۵۰۰ mg/kg/bw/day بودند که به مدت ۸ هفته گاوژ گردیدند. در پایان هفته هفتم به‌صورت ناشتا تست تحمل گلوکز انجام گردید و در پایان به‌صورت ناشتا نمونه خون برای اندازه‌گیری متغیرها گرفته شد (گلوکز، انسولین، مقاومت به انسولین و شاخص حساسیت به انسولین از سرم و هموگلوبین گلیکوزیله A1c از خون تام). نتایج با آزمون‌های ANOVA و دانکن آنالیز شدند. معناداری اختلاف داده‌ها در سطح $P < 0.01$ در نظر گرفته شد.

نتایج: دی اتیل هگزیل فتالات در دوز پایین (۲۵۰ mg/kg) به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش قند خون سرم و مقاومت به انسولین سرمی و به‌طور معنی‌داری موجب کاهش شاخص حساسیت انسولین ($P < 0.01$) شد و در گروه‌های مختلف آزمایش شاخص سرمی انسولین، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) خون تام و سطح زیر منحنی (AUC) برای تست تحمل گلوکز تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.01$).

نتیجه‌گیری: در این تحقیق نشان داده شد دی اتیل هگزیل فتالات در دوز پایین (۲۵۰ mg/kg/bw/day) موجب اختلال در سیستم‌های تنظیمی قند خون و ایجاد پیش دیابت می‌شود.

کلمات کلیدی: دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات (DEHP)، پاسخ گلاسیمی، موش سوری

مقدمه

به‌طور گسترده روزانه در زندگی روزمره در معرض دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات قرار می‌گیرند (۱). فتالات‌ها دارای حلالیت کم در آب، حلالیت بالا در روغن، فراریت کم و نسبتاً غیر قطبی هستند. دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات بی‌رنگ و بی‌بو بوده و از واکنش بین انیدرید فتالیک با یک الکل مناسب (معمولاً ۱۳-۶ کربنه) تولید می‌شوند (۲). فعالیت زیستی DEHP بسیار شبیه به گروهی از مواد شیمیایی است که به‌عنوان تکثیردهندگان پراکسی زوم شناخته می‌شوند (۳). دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات از نظر شیمیایی به پلیمر متصل نمی‌شود و در زمان تولید و استفاده از پلی وینیل کلراید جدا می‌شود (۴)؛ لذا دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات می‌تواند از طریق هوا، آب، غذا و حتی از طریق

دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات (DEHP^۱) استفاده گسترده‌ای به‌عنوان نرم‌کننده در ساخت تولیدات پلی وینیل کلراید (PVC)، اسباب‌بازی‌ها، وسایل پزشکی، بسته‌بندی‌های غذایی، لوازم‌آرایشی و محصولات لبنی دارد، دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات یکی از فراوان‌ترین فتالات‌های مورد استفاده است و یکی از مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز (EDC^۲) است، قرار گرفتن بیشتر در معرض دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات می‌تواند منجر به اختلال عملکرد سلول‌های بتا، هموستاز گلوکز و تغییراتی در محتوای گلیکوژن کبدی در رت‌ها شود. انسان‌ها

*نویسنده مسئول: بهزاد نجمی کرگان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
Email: behzad.najmi@yahoo.com

کیلوگرم وزن رت همراه با ویتامین E (HFD+DEHP+VIT E) E سطح گلوکز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و غلظت انسولین سرم افزایش نشان داده بود (۱۶). هدف از این مطالعه اثر ترکیب سطوح دی اتیل هگزیل فتالات به همراه رژیم غذایی پرچرب بر پاسخ گلاسیمی نشان داده شده است. به نقش فتالات در بالا اشاره گردید و به دلیل اینکه مصرف هم‌زمان هر دو رژیم غذایی پرچرب و فتالات یک رویداد روزانه است این مطالعه از اهمیت زیادی برخوردار است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق از ۱۵ سر موش سوری نر بالغ نژاد NMAR در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم که از دانشکده دامپزشکی آزاد تبریز تهیه شد و در اتاق حیوانات همان واحد در دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند، استفاده گردید. آب و غذای کافی همواره در دسترس آن‌ها قرار داده شد. بعد از ۵ روز سازگاری با محیط به‌طور تصادفی ساده به ۳ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. غذای مصرف موش‌ها از ۵۰ درصد چربی اشباع حیوانی و ۵۰ درصد غذای پایه موش تشکیل شده بود.

آماده‌سازی فتالات

دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP, Farabi Petrochemical, CAS no. 117-81-7) به مقدار ۸۰ میلی‌لیتر از پتروشیمی فارابی در ظرف کاملاً بسته‌بندی‌شده تهیه شد. فتالات تهیه‌شده به‌صورت مایع روغنی است که دارای درصد خلوص ۹۸٪ و چگالی آن ۰/۹۸۶۱ گرم بر میلی‌لیتر است که برای دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش محاسبه گردید و به همراه روغن ذرت روزانه برای گروه‌های مداخله گاوژ گردید.

گروه‌بندی حیوانات

غذای مصرفی موش‌ها از ۵۰ درصد چربی اشباع حیوانی (پیه گوساله) و ۵۰ درصد غذای معمولی تشکیل شده بود. گروه شاهد (کنترل): به‌صورت روزانه ۵۰٪ چربی اشباع حیوانی به همراه ۵۰٪ غذای پایه موش بدون گاوژ خوراند. گروه ۲: روزانه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش دی اتیل هگزیل فتالات محلول در قالب ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن موش روغن ذرت به موش‌ها به‌صورت گاوژ خوراند.

تماس پوستی به انسان منتقل شود (۵). کیسه‌های ذخیره‌سازی خون و فراورده‌های خونی، وسایل تزریق و همودیالیز و لوله‌های تراشه، حاوی مقادیر زیادی دی اتیل هگزیل فتالات هستند. مقدار زیادی DEHP در خون و بافت‌های بیمارانی که به‌دفعات زیاد انتقال خون انجام می‌دهند، یافت می‌شود (۶).

با این وجود منبع اصلی آلودگی انسان به دی اتیل هگزیل فتالات از طریق خوراکی است. اعتقاد بر این است که در جمعیت عمومی در غذاها با چربی بالا به‌عنوان منبع اصلی قرار گرفتن در معرض با دی اتیل هگزیل فتالات پیدا شده است (۷). میزان گردش فتالات در سرخرگ کاروتید با خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و همچنین کلسترول و فشارخون بالا همراه است (۸). در همین حال، شواهد منجر به تشکیل فرضیه شده است که بر این مبنای برخی از این مواد شیمیایی، مانند بیس- فنول آ و همچنین فتالات، ممکن است به بیماری‌های همه‌گیر افزایش چاقی و دیابت نوع ۲ منجر شود (۹). اثرات فتالات‌ها در آسیب کبدی، استرس اکسیداتیو، علائم آلرژیک و عملکرد ریوی گزارش شده و مردم به‌راحتی در زندگی روزانه خود در معرض فتالات‌ها قرار می‌گیرند. استرس اکسیداتیو در شرایط پاتولوژیک مانند دیابت ملیتوس نقش بسیاری بازی می‌کند. فتالات‌ها می‌توانند باعث استرس اکسیداتیو شوند که نقش مهمی در توسعه مقاومت به انسولین (IR) دارد (۱۰).

طی مطالعه‌ای در زنان بالغ ایالات‌متحده مشخص شده است که سطوح چند نوع فتالات در ادرار آن‌ها با خطر ابتلا به دیابت مرتبط است. زنان با بالاترین سطوح از برخی فتالات دو برابر خطر ابتلا به دیابت نسبت به کسانی که با پایین‌ترین سطوح از فتالات بودند، نشان دادند (۱۱). محققان دریافتند که میان متابولیت‌های فتالات ادراری با افزایش سطح قند خون در حالت ناشتا، سطح انسولین و مقاومت به انسولین (۱۲) و همچنین با ریسک بروز دیابت نوع ۲ ارتباط دارد (۱۳). انسان روزانه در معرض فتالاتی به میزان ۰/۰۵، ۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن است (۱۴). مطالعات نشان دادند که تغییرات در سطوح متابولیت‌های DEHP در ادرار با مقاومت انسولین، بلوغ و همچنین با چاقی ارتباط دارد (۱۵). بررسی‌ها نشان داده است که در افرادی که مقاومت به انسولین و سطوح فتالات بالا داشتند استرس اکسیداتیو نیز افزایش یافته است (۱۰). طی مطالعه‌ای روی رت‌ها مشاهده شده است که در گروه رت‌ها با رژیم غذایی پرچرب در معرض دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر

$HOMA-IR = [22/5 \div \text{گلوکز ناشتا (میلی مول بر لیتر)} \times \text{انسولین ناشتا (میکرویونیت بر میلی لیتر)}]$ و همچنین حساسیت به انسولین سرم از شاخص بررسی کمی حساسیت به انسولین ($QUICKI^3$) استفاده گردید. طبق فرمول: $QUICKI = 1 / [\text{لگاریتم انسولین ناشتا (mU/ml)} + \text{لگاریتم قند خون ناشتا (mg/dL)}]$ ، که این شاخص بر اساس معکوس مجموع لگاریتم غلظت انسولین ناشتا و گلوکز خون ناشتا اندازه‌گیری می‌شود (۱۸). برای اندازه‌گیری هموگلوبین A1c، ۵۰ میکرولیتر خون تام از هر موش در ویال‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA) تهیه شد و با روش کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از کیت مربوطه (BioSystems, Spain) اندازه‌گیری شد به صورتی که هر دو گروه از لوله‌ها یکی لوله HbA1C و دیگری Hb توتال را در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۱۵ نانومتر (nm) خوانده شد و طبق فرمول درصد HA1bC محاسبه گردید. تمام مراحل آزمایش برای موش‌ها با رعایت کامل موازین اخلاقی از نظر در اختیار قرار دادن آب و غذا و بی‌هوش کردن قبل از نمونه‌گیری انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست آماری آنالیز واریانس یک‌طرفی و آنالیز تست آماری دانکن (Post Hoc) بررسی شدند و نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ نشان داده شد. ($P < 0.01$) به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

همان‌طور که در جدول زیر نشان داده شده است تجزیه واریانس یک‌طرفی (ANOVA) داده‌های به‌دست‌آمده در گروه‌های مختلف آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین متوسط سرمی گلوکز، مقاومت به انسولین و شاخص Quicki

گروه ۳: به‌صورت روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش دی اتیل هگزیل فتالات محلول در قالب ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن موش روغن ذرت به هر قطعه موش به‌صورت گاواژ خورانده شد. دوزهای دی اتیل هگزیل فتالات با استفاده از مطالعات قبلی (۲۲-۱۶) انتخاب شده است که در دو سطح (کمینه و بیشینه) مورد مقایسه قرار گرفته شده است.

روش‌های بیوشیمیایی

در پایان هفته هفتم بعد از ۱۶ ساعت ناشتا قند خون موش‌ها توسط گلوکومتر از دم موش‌ها اندازه گرفته شد و برای انجام تست تحمل خوراکی گلوکز ($OGTT^1$) به هر موش به مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول قندی ۵۰٪ به‌صورت گاواژ خورانده شد، سپس توسط دستگاه گلوکومتر (On Call EZ, SD, USA) در زمان‌های ۳۰-۶۰-۹۰-۱۲۰ دقیقه قندخون موش‌ها اندازه‌گیری گردید (۱) و مساحت زیر منحنی در گروه‌های مختلف به روش دوزنقه محاسبه گردید.

بعد از پایان ۸ هفته، نمونه خون بعد از ۱۶ ساعت ناشتا از موش‌های بی‌هوش شده توسط اتر گرفته شد. خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام گردید و در لوله‌های استریل جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و جداسازی سرم، تعیین میزان گلوکز سرم با استفاده از کیت مربوطه (شرکت پارس آزمون) به روش آنزیمی، کالریمتری برای اندازه‌گیری تک نقطه‌ای با روش فتومتریک (Unico 1200) صورت گرفت، میزان انسولین سرم با استفاده از کیت مربوطه (Mouse Insulin (INS) ELISA Kit, China, Cat.No&Brand : Estbiopharm, CK-E20353) به روش الیزا اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری مقاومت به انسولین از شاخص ارزیابی مدل هموستاز ($HOMA^2$) استفاده شد که این شاخص بر اساس غلظت قند خون ناشتا و غلظت انسولین ناشتا طبق فرمول زیر محاسبه یافت (۱۷):

جدول ۱- میزان متوسط پارامترهای بیوشیمیایی ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) در گروه‌های مختلف آزمایش

گروه	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	هموگلوبین گلیکوزیله (درصد)	انسولین (میکرویونیت بر میلی‌لیتر)	مقاومت به انسولین	شاخص حساسیت به انسولین	سطح زیر منحنی
شاهد (کنترل)	$61/32 \pm 7/03^b$	$12/167 \pm 1/49^a$	$4/66 \pm 0/203^a$	$0/70 \pm 0/08^b$	$0/407 \pm 0/007^a$	$351/50 \pm 31/19^a$
فتالات ۲۵۰ mg/kg	$102/00 \pm 7/03^a$	$13/132 \pm 1/49^a$	$5/50 \pm 0/203^a$	$1/37 \pm 0/08^a$	$0/365 \pm 0/007^b$	$449/00 \pm 31/19^a$
فتالات ۵۰۰ mg/kg	$56/25 \pm 6/08^b$	$10/300 \pm 1/29^a$	$5/50 \pm 0/176^a$	$0/75 \pm 0/07^b$	$0/404 \pm 0/006^a$	$461/88 \pm 27/02^a$

حروف نامشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0.01$) است

کم دی اتیل هگزیل فتالات ($7/5 \text{ mg/kg/day}$) موجب اختلال در سیستم هورمونی و افزایش گلوکز سرم می‌گردد (۲۰). نتایج مطالعه‌ای دیگر حاکی از آن است که گلوکز سرم در رت‌های گروه مداخله با غذای پرچرب به همراه دی اتیل هگزیل فتالات با دوز 500 mg/kg نسبت به گروه‌های دیگر بدون مداخله فتالات به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (۱۶) و همین‌طور نتایج حاصل از بررسی در رت‌ها نشان داده است که دی اتیل هگزیل فتالات با دوز 500 mg/kg گلوکز سرم را افزایش می‌دهد (۲۱)؛ که این نتایج با یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر تطابق دارد. دلیل افزایش گلوکز این است که دی اتیل هگزیل فتالات سبب مقاومت به انسولین و اختلال در سیگنالینگ انسولین و بیان وابسته به دوز گلوکز ترانسپورتر ۴ (GLUT_4) در غشای پلاسمایی شده و از این طریق منجر به افزایش گلوکز سرم می‌شود. DEHP باعث پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و این ممکن است تغییراتی در غشاء ایجاد کند و در نتیجه کاهش GLUT_4 متصل به غشاء شود (۲۲). طی بررسی‌ها روی موش‌های مستعد به بیماری‌های قلبی ژنتیکی، طی مداخله با دی اتیل هگزیل فتالات با دوز 100 mg/kg به همراه غذای پرچرب در هفته‌های اول افزایش گلوکز داشتند ولی در آخر تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان ندادند و دلیل آن این است که فتالات سبب القا سیتوکروم P450 و آنزیم‌های دیگر که قادر به متابولیزه کردن آن‌ها هستند می‌شود (۱۹).

مقایسه میانگین در گروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) خون تام وجود ندارد ($P > 0/01$). طی مطالعه‌ای نشان داده شده است که در زنان ارتباط معنی‌داری میان سطح متابولیت‌های فتالات ادراری و سطح هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) خون تام وجود ندارد (۱۱) که احتمالاً فتالات تأثیر کمی بر گلیکوزیله شدن گلبول‌های قرمز دارد ولی مطالعات با مدت طولانی برای ارزیابی صحیح این داده‌ها لازم است.

محققان دریافته‌اند که برخی سطوح فتالات باعث افزایش سطح گلوکز سرمی، انسولین سرم و مقاومت به انسولین می‌شود (۱۲). در تحقیق حاضر، مقاومت به انسولین سرمی در گروه دریافت‌کننده دی اتیل هگزیل فتالات 250 mg/kg/day نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و شاخص Quicki کاهش نشان داد ($P < 0/01$) و سطح انسولین سرمی در تمام گروه‌ها تغییرات معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/01$). در

سرم وجود دارد ($P < 0/01$). در آزمون مقایسه چند دامنه‌ای دانکن برای میانگین مقادیر گلوکز سرمی، مقاومت به انسولین و شاخص Quicki سرم در گروه‌های مختلف، در گروه فتالات 250 mg/kg میزان گلوکز و مقاومت به انسولین نسبت به گروه‌های دیگر افزایش نشان داد و در گروه فتالات 250 mg/kg میزان شاخص Quicki به‌صورت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/01$). تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) داده‌های به‌دست‌آمده در گروه‌های مختلف آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین متوسط سطح انسولین سرمی، سطح هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) خون تام و در ارزیابی سطح زیر منحنی (AUC) برای تست تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) وجود ندارد ($P > 0/01$) (جدول ۱).

بحث

رژیم غذایی با چربی بالا در شیوع بالای چاقی، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی عروقی شناخته شده است. فتالات موجود در ظروف پلاستیکی به داخل غذاها و نوشیدنی‌ها منتقل می‌شوند. مصرف هم‌زمان هر دو رژیم غذایی پرچرب و فتالات یک واقعیت روزانه است (۱۹). با توجه به نقش رژیم غذایی پرچرب در شیوع دیابت نوع ۲، در مطالعه حاضر غذای مصرفی تمام گروه‌ها از ۵۰ درصد چربی اشباع حیوانی و ۵۰ درصد غذای معمولی موش تشکیل شده بود. اعتقاد بر این است که در جمعیت عمومی در غذاها با چربی بالا به‌عنوان منبع اصلی قرار گرفتن در معرض با دی اتیل هگزیل فتالات پیدا شده است (۷).

در پژوهش حاضر اثر ترکیب سطوح دی اتیل هگزیل فتالات به همراه رژیم غذایی پرچرب بر پاسخ گلاسمی نشان داده شده است. بر اساس فرضیه انتظار بود سطوح فتالات خوراکی موجب تغییر پاسخ گلاسمی و بروز مقاومت انسولینی در موش سوری شود. در این تحقیق نشان داده شد که دی اتیل هگزیل فتالات با دوز پایین (250 mg/kg) اثرات بیشتری ایجاد نموده است ($P < 0/01$). فتالات در دوز پایین به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش قند خون نسبت به گروه شاهد گردید لکن این افزایش به‌صورت وابسته به دوز نبود به‌طوری‌که میزان قند خون گروه فتالات 500 mg/kg اختلاف آماری معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($P > 0/01$) که احتمالاً مقادیر بیشتر فتالات با فعال کردن مکانیسمی موجب هیپوگلیسمی خواهد شد و یا تأثیری نشان نمی‌دهد. طی مطالعه‌ای روی رت‌ها مشاهده شده است که مقادیر

انجام شده در رت‌ها نشان داده شده است که میزان قند خون در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه در گروه مداخله با غذای پرچرب به همراه DEHP با دوز ۵۰۰ mg/kg/day نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری داشت که می‌تواند به دلیل کاهش انسولین سرم باشد (۱۶). ولی در تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری در سطح انسولین سرم در بین گروه‌های مختلف آزمایش مشاهده نشد ($P > 0.01$).

نتیجه‌گیری

دیابت نوع ۲ در نرخ بیماری‌های همه‌گیر در طول چند دهه اخیر در آمریکا و اروپا و اخیراً بیشتر در کشورهای در حال توسعه افزایش یافته است. عوامل خطر ساز مانند رژیم غذایی، شیوه زندگی و ژنتیک نمی‌توانند به‌طور کامل دلیل این پدیده شوند و شواهد نشان می‌دهد که حضور آلاینده‌های زیست‌محیطی نقش مهمی در بروز افزایش ابتلا به دیابت نوع ۲ دارند مواد شیمیایی‌های مختل ساز غدد درون‌ریز (EDCs) که دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) یک مواد شیمیایی مختل ساز غدد درون‌ریز (EDC) است و بسیاری از مردم در زندگی روزمره در معرض آن‌ها قرار می‌گیرند. در این تحقیق نشان داده شد دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات در دوز پایین موجب اختلال در سیستم‌های تنظیمی قند خون و ایجاد پیش دیابت می‌شود؛ بنابراین جهت اطلاع از نحوه مکانیسم اثر دی اتیل هگزیل فتالات نیاز به مطالعات متابولیسمی و مولکولی بیشتری است.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از کلیه افرادی که در انجام این مطالعه ما را یاری نموده‌اند، به‌ویژه کارکنان بخش کلینیک حیوانات و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی در دانشگاه آزاد تبریز و همچنین از همکاری شرکت پتروشیمی فارابی در تهیه فتالات تشکر نماییم. نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است. کمیته اخلاق دانشگاه تحقیق را تأیید کرده است. این مقاله برگرفته از پایان نامه تحصیلی آقای بهزاد نجمی کرگان کارشناس ارشد گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی اهر با شماره ثبت ۲۲۰۳۰۵۲۰۹۳۱۰۰۴ می‌باشد و تمامی حقوق آن متعلق به این دانشگاه می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

مطالعه‌ای مشابه اثبات شده است که دوز پایین ($7/5 \text{ mg/kg}$) دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات در رت‌ها باعث کاهش انسولین سرم می‌شود (۲۰). نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داد که انسولین سرمی گروه مداخله با غذای پرچرب به همراه دی اتیل هگزیل فتالات با دوز 500 mg/kg نسبت به گروه‌های بدون مداخله فتالات کاهش یافته است که به دلیل اختلال در پانکراس و در نتیجه باعث مختل کردن عملکرد سلول بتا می‌شود (۱۶)؛ که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد چون که سطح انسولین سرمی در تمام گروه‌ها تغییرات معنی‌داری نداشت ($P > 0.01$). با توجه به اینکه شاخص HOMA-IR از میزان قند خون ناشتا و انسولین ناشتا محاسبه و هر دو مقدار در صورت کسر قرار دارد، بنابراین افزایش عدد مربوط به این مدل، بیانگر مقاومت انسولینی در فرد است (۲۳) و با توجه به اینکه مقدار شاخص HOMA-IR در تحقیق حاضر در گروه فتالات در دوز پایین (250 mg/kg) به‌طور معنی‌دار افزایش یافته است ($P < 0.01$)، بنابراین فتالات در دوز پایین موجب بروز مقاومت انسولینی شده است. افزایش مقدار فتالات دریافتی از 250 mg/kg/day به 500 mg/kg/day اثر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بر شاخص HOMA-IR نداشت ($P > 0.01$) همان‌طور که در دوز 500 mg/kg مقدار گلوکز کاهش یافته در شاخص مقاومت به انسولین هم نسبت به گروه فتالات 250 mg/kg کاهش یافته است. فتالات‌ها گیرنده‌های هورمون خاصی را فعال می‌کنند که گیرنده‌های فعال شده با تکثیرکننده‌های پرواکسیزوم (PPARs) می‌نامند. PPARs از طریق تأثیر بر روی مقاومت به انسولین، ترشح انسولین و مقدار معمول چربی‌ها، بر روی تعادل گلوکز خون تأثیر دارند (۲۴). در تحقیق حاضر شاخص Quicki در گروه دریافت‌کننده دی اتیل هگزیل فتالات 250 mg/kg نسبت به گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ($P < 0.01$).

شاخص Quick قابل اطمینان، تکرارپذیر و دقیق است و ارزشمندتر از شاخص HOMA-IR است. از آنجایی که در این روش از لگاریتم معکوس میزان گلوکز و انسولین استفاده می‌شود، هرچقدر میزان قند خون و انسولین بیشتر باشد، عدد شاخص کوچک‌تر خواهد بود که درواقع بیانگر حساسیت به انسولین است (۱۸، ۲۵).

مقایسه میانگین سطح زیر منحنی برای تست تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) در گروه‌های مختلف آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.01$). طی مطالعه‌ی



References

1. Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song L, et al. Developmental exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am Physiol Soc*. 2011; 301(3): 527-38.
2. Chen WCHuang HC, Wang YS, Yen JH. Effect of benzyl butyl phthalate on physiology and proteome characterization of water celery (*Ipomoea aquatic* Forsk.). *Ecology and Environmental Safety*. 2011; 74 (5): 1325-30.
3. Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Effects of DEHP in the liver: Modes of action and species-specific Differences. *Crit Rev Toxicol*. 2006; 36(5): 459-79.
4. Fountoulakis MS, Stamatelatos K, Batstone DJ, Lyberatos G. Simulation of DEHP biodegradation and sorption during the anaerobic digestion of secondary sludge. *Water Sci Technol*. 2006; 54(4): 119-128.
5. Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W, Camann DE, Barr D, Jacek R, et al. Prenatal Exposures to Phthalates among Women in New York City and Krakow, Poland. *Environmental Health Perspectives*. 2003; 111(14): 1719-22.
6. Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenaka, et al. Spermatogenic disturbance induced by di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int J Androl*. 2000; 23(2): 85-94.
7. Kwak ES, Just A, Whyatt R, Miller RL. Phthalates, pesticides, and Bisphenol-A Exposure and the development of non-occupational asthma and allergies: How valid are they? *Open Allergy J*. 2009; 2 (1): 45-50.
8. Wiberg B, Lind PM, Lind L. Serum levels of monobenzylphthalate (MBzP) is related to carotid atherosclerosis in the elderly. *Environ Res*. 2014; 133: 348-52.
9. Olsen L, Lind L, Lind PM. Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate bolites and coronary risk in the elderly. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012; 80: 179-83.
10. Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC. Diethyl hexyl Phthalates Is Associated with Insulin Resistance via Oxidative Stress in the Elderly: A Panel Study. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71392.
11. James-Todd T, Stahlhut R, Meeker JD, Powell SG, Hauser R, Huang T, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the Health and National Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008. *Environmental Health Perspectives*. 2012; 120 (9): 1307-13.
12. Huang T, Saxena AR, Isganaitis E, James-Todd T. Gender and racial/ethnic differences in the associations of urinary phthalate metabolites with markers of diabetes risk: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2008. *Environmental Health*. 2014; 13(1): 6.
13. Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, Tobias DK, Eliassen AH, Franke AA, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect*. 2014; 122 (6): 616-23.
14. Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B. Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice. *Environ Health Perspect*. 2012; 120 (8): 1123-29.
15. Smerieri A, Testa C, Lazzeroni P, Nuti F, Grossi E, Cesari S, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites in urine show age-related changes and associations with adiposity and parameters of insulin sensitivity in childhood. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0117831.
16. Nisubire D, Zeng Q, Yang Xu. Di- (2-ethylhexyl) Phthalate is Associated with Impairments of Glucose Metabolism and Inflammatory Process in Glucose Homeostatic Organs in Mice Fed Fat Diet: The Role of the Antioxidant Vitamin E. *Life Sci J*. 2014; 11(5): 76-83.
17. Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002; 25(7): 1177-84.
18. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294(1): E15-26.
19. Zhou W, Chen MH, Weibin S. Influence of phthalates on glucose homeostasis and atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *BMC Endocrine Disorders*. 2015; 15:13.
20. Gayathri NS, Dhanya CR, Indu AR, Kurup PA. Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags medical tubing. *Indian J Med Res*. 2004; 119(4): 139-44.
21. Kwack SJ, Young Han E, Park JS, Bae JY, Ahn Y, Lim SK, et al. Comparison of the Short Term Toxicity of Phthalate Diesters and Monoesters in Sprague-Dawley Male Rats. *Toxicol Res*. 2010; 26(1): 75-82.
22. Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, Selvaraj J, Balasubramanian K. Phthalate is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: role of antioxidant vitamins (C & E). *J Cell Biochem*. 2013; 114(3): 558-69.
23. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004; 27(6): 1487-95.
24. Lind PM, Zethelius B, Lind L. Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly. *Diabetes Care*. 2012; 35(7): 1519-24.
25. Borai A, Livingstone C, Kaddam I, Ferns G. Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance. *BMC Med Res Methodol*. 2011; 23(11): 158-59.



Original Article

The Effects of Levels of Oral Di-(2-ethylhexyl) Phthalate on Glycemic Response in Mice

Najmi kargan B^{1,*}, Kargari Rezapour A², SharifiR¹

1. Department of Biologhy, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Ahar, Ahar, Iran

2. Department of Clinical pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 19 Oct 2016

Accepted: 03 May 2017

Abstract

Background & Objective: Humans are widely exposed to di-(2-ethylhexyl) phthalate that it can rise obesity and type 2 diabetes epidemics. The object of this study was to investigate the effects of oral di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) at minimum and maximum levels on glycemic response in mice.

Material & Methods: An interventional study with 15 adult male mice was designed. Mice were randomly assigned to 3 equal groups: control, 1x phthalate (dose of 250 mg/kg/day), 2x phthalate (dose of 500 mg/kg/day) and treated for a period of 8 weeks. At the end of the seventh week study all mice were tested by oral glucose tolerance test and area under curve (AUC) was calculated for each sample. In the end, fasting blood samples were used to measure the variables (Glucose, Insulin, HOMA_IR, Quicki of serum and HbA1C of total blood). The data were analyzed by ANOVA and Duncan tests. The significant difference in the data was considered $P > 0.01$.

Results: Di-(2-ethylhexyl) phthalate at low dose (250 mg/kg) showed significant increase in serum glucose and insulin resistance levels and also quicki levels decreased significantly compared to other groups ($P < 0.01$). This study showed no significant changes in insulin serum, glycated hemoglobin (HbA1c) of total blood and area under the curve in glucose tolerance test ($P > 0.01$).

Conclusion: In the present study, it showed di-(2-ethylhexyl) phthalate at low dose (250 mg/kg) impaired blood sugar control systems and this can lead in pre-diabetes.

Keywords: Di-(2-ethylhexyl) phthalate, Glycemic response, Mice

*Corresponding Author: Behzad Najmi Kargan, Department of Biologhy, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Ahar, Ahar, Iran
E-mail: behzad.najmi@yahoo.com