

اثرات فورموننتین حاصل از شبدر قرمز در دوره حاملگی بر بلوغ، برخی شاخصهای تولیدمثلی و رفتار لوردوز موشهای ماده

رحمت اله پرندین*، لیلی محمدی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۵/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱

چکیده

زمینه و هدف: فورموننتین یک فیتواستروژن گیاهی غیراستروئیدی پلی فنولیک با خواص شبه استروژنی می‌باشد که در برخی گیاهان از جمله شبدر قرمز یافت می‌شود. هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی اثرات فورموننتین در طی حاملگی موش‌ها بر آغاز بلوغ، چرخه استروس، وزن اندام‌های تناسلی و رفتار لوردوز فرزندان آن‌ها بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه پیام نور کرمانشاه انجام شد، تعداد ۲۰ سر موش حامله به طور تصادفی به ۵ گروه شامل؛ کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (روغن کنجد) و سه گروه تجربی دریافت کننده فورموننتین با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. کلیه تجویزها از روز ۷ آبستنی تا پایان بارداری به صورت داخل صفاقی به موش‌های حامله انجام شد. فرزندان ماده (۶-۸=تعداد) جهت بررسی روز بازشدن واژن، چرخه استروس، وزن اندام‌های تولید مثلی و همین‌طور رفتار لوردوز مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری کولموگروف اسمیرنوف، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: روز بازشدن واژن در گروه ۵۰۰ فورموننتین ($p < 0/01$) به طور معنی‌داری جلو افتاد. اولین استروس در گروه‌های ۵۰ ($p < 0/05$) و ۵۰۰ ($p < 0/01$) به طور معنی‌داری با تأخیر مشاهده شد. کاهش تعداد چرخه‌های استروس و افزایش مدت زمان چرخه استروس در گروه ۵۰۰ ($p < 0/05$) و افزایش شاخص دی استروس در گروه‌های ۵۰ ($p < 0/05$) و ۵۰۰ ($p < 0/01$) مشاهده شد. کاهش وزن تخمدان و کاهش تعداد جسم زرد در گروه ۵۰ ($p < 0/05$) و افزایش وزن رحم ($p < 0/05$) در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ مشاهده شد. به علاوه افزایش غلظت استرادیول در گروه‌های ۵۰ ($p < 0/05$) و ۵۰۰ ($p < 0/01$) فورموننتین و کاهش غلظت LH و کاهش فاکتور لوردوز در گروه ۵۰۰ ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه موش‌های حامله با فورموننتین منجر به بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس، تغییر وزن اندام‌های جنسی و کاهش رفتار جنسی در فرزندان جنس ماده آنها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فورموننتین، فیتواستروژن، تولیدمثل، تخمدان.

* نویسنده مسئول: دکتر رحمت اله پرندین، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی

Email: rahmatparandin@pnu.ac.ir

مقدمه

عنوان ترکیبات مداخله‌گر اندوکرینی و هورمونی عمل کرده و موجب اختلالات متعدد از جمله ناباروری، یا کم باروری در انسان و احشام و بروز سرطان‌های وابسته به هورمون شوند. در حال حاضر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اختلالات تولید مثلی بزرگترین نگرانی عواقب مصرف فیتواستروژن‌ها در انسان و حیوان می‌باشد (۱ و ۳).

پژوهش‌ها در طی سال‌های گذشته نشان داده‌اند که نگرانی در مورد سمیت تولیدمثلی در نتیجه مصرف فیتواستروژن‌های خوراکی افزایش یافته است. مطالعات نشان داده‌اند که اثرات فیتواستروژن‌ها بر تکوین و عملکرد دستگاه تولیدمثلی به سن و مدت زمان مواجهه با این ساختارها بستگی دارد، اما دوران جنینی بیشترین حساسیت را نسبت به ترکیبات مداخله‌گر هورمونی از جمله فیتواستروژن‌ها نشان می‌دهد، زیرا در این پنجره بحرانی هورمونی، اندام‌زایی، رشد سریع و تمایز بافتی وسیع اتفاق می‌افتد. به علاوه فرآیندهای متابولیک و مکانیسم‌های سم‌زدایی در جنین ناکافی می‌باشند. بنابراین حضور هرچند اندک این قبیل ترکیبات شبه هورمونی در دوره جنینی می‌توانند عواقب مهم و دایمی را بر جای بگذارند (۳-۵). عملکرد دقیق تولید مثلی جنس ماده، به تمایز جنسیتی صحیح مدارهای نورواندوکرینی مغز در طی دوره‌های بحرانی هورمونی از جمله دوران حاملگی و نوزادی بستگی دارد. در طی این دوره‌های بحرانی مغز چونندگان ماده از مواجهه هورمون‌های استروژن به دلیل اتصال آنها با آلفا-فتوپروتئین

فیتواستروژن‌ها، ترکیب‌های پلی فنولیک گیاهی و غیراستروئیدی‌اند که از لحاظ ساختار شیمیایی مشابه استروژن‌های پستانداران به ویژه هورمون ۱۷-بتا استرادیول می‌باشند. بنابراین این ترکیب‌ها قادر به واکنش با گیرنده‌های استروژن و در نتیجه تحریک یا مهار پاسخ‌های استروژنی در داخل بدن می‌باشند. همچنین این ترکیبات به عنوان بخشی از رژیم غذایی گیاهی دارای مصارف انسانی و حیوانی می‌باشند. مهم‌ترین گروه‌های فیتواستروژن‌ها شامل ایزوفلاونوئیدها (جنیستین، دایدزین، گلیسیتین و فورمونونتین)، فلاون‌ها (کوئرستین و کامفرول)، کومستان‌ها (کامسترول)، استیلبن‌ها (رزوراترول) و لیگان‌ها (انترولاکتون و انترودیول) می‌باشند. ایزوفلاونوئیدها به مقدار زیادی در گیاهانی مثل سویا و شبدر یافت می‌شوند، در صورتی که لیگان‌ها اغلب در کتان، کومستان‌ها در شبدر و استیلبن‌ها در محصولاتی مثل انگور به ویژه شراب قرمز یافت می‌شوند (۱ و ۲). بسیاری از پژوهش‌ها نشان از اثرات مثبت و مفید فیتواستروژن‌ها بر جنبه‌های مختلف سلامتی بدن از جمله؛ در بهبود آرترواسکلروزیس، استئوپوروزیس، آنژیوزنزیس، دیابت و آوزموتور در زنان یائسه دارد. همین‌طور بعضی پژوهش‌ها عملکرد فیتواستروژن‌ها را به عنوان آنتی‌اکسیدانت، آنتی‌نئوپلاستیک، ضد التهابی و پروبیوتیک نیز گزارش کرده‌اند. با وجود موارد گفته شده برخی پژوهش‌ها تأکید دارند که فیتواستروژن‌ها می‌توانند به

و شرایط محیطی رویش دارد و ارزش غذایی بالایی برای نشخوارکنندگان دارد. شبدر قرمز در نقاط مختلف جهان کاشته می‌شود یا به طور خودرو نیز در سطح جهان پراکندگی دارد. در ایران نیز در بسیاری از مناطق از جمله؛ آذربایجان، گیلان، مازندران، کردستان، کرمانشاه، تهران رویش دارد (۹).

در پژوهش‌های قبلی اثرات سودمند مکمل‌های غذایی تولید شده از شبدر قرمز بر گرگرفتگی، پوکی استخوان و سایر عوارض ناشی از یائسگی در زنان گزارش شده است (۱۰). به علاوه اثرات ضد میکروبی، هیپولیپیدمیک، نوروپروتکتیو، آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌تومور فورمونونتین نشان داده شده است (۷). در پژوهش‌های دیگری اثرات این ایزوفلاونوئید در درمان آنتی‌آدیپوزنزیس و کاهش چربی و وزن بدن (۱۱) و آنتی‌آدیپوزنزیس از راه تحریک گیرنده‌های استروژنی (۱۲) بیان شده است. همین‌طور بررسی‌های متعدد بر خاصیت استروژنیک فورمونونتین تأکید دارند (۱۰ و ۷، ۱).

با این وجود در جال حاضر اطلاعاتی در مورد اثرات استروژنیک فورمونونتین بر تکوین و عملکرد دستگاه تولیدمثل به دنبال مواجهه جنینی وجود ندارد. بنابراین مطالعه حاضر بر تیمار موش‌های حامله با فورمونونتین و اثرات آن بر زمان آغاز بلوغ جنسی، چرخه استروس، وزن اندام‌های جنسی، تولید جسم زرد و رفتار جنسی در فرزندان بالغ نسل اول متمرکز شد.

سیستمیک محافظت می‌شود، چرا که آلفا-فتوپروتئین قادر به عبور از سد خونی مغزی نمی‌باشد و به همین دلیل هورمون استروژن قادر به تأثیر بر تکوین مغز ماده نمی‌باشد، اما مواجهه با ترکیبات شبه استروژنیک محیطی احتمالاً توانایی اتصال با آلفا-فتوپروتئین سیستمیک را نداشته و بنابراین قادر به عبور از سد خونی مغزی بوده و می‌توانند بر تکوین مدارهای نورواندوکرینی مغز ماده اثرات سوء داشته یا منجر به نرینه‌سازی مغز در جنس ماده شوند. در مواجهه با ترکیبات شبه استروژن از جمله معادل جنیستین و اکتیل‌فنول این اختلالات مشاهده شده است (۶ و ۳).

فورمونونتین، ۷-هیدروکسی -۳ (۴-متوکسی فنیل) کرومون، $C_{16}H_{12}O_4$ یک فیتواستروژن ایزوفلاونوئیدی موجود در برگ گیاهانی مثل شبدر قرمز (*Trifolium pratense* L)، ریشه گون و ریشه شیرین بیان می‌باشد که دارای ساختار شیمیایی مشابه هورمون استرادیول بوده و قادر به اتصال با گیرنده‌های استروژن می‌باشد. این ایزوفلاونوئید همین‌طور به مقدار کمتری در گیاهان خوراکی مثل سویا، لوبیا، گل کلم، نخود سبز نیز یافت می‌شود (۷ و ۱). در حدود ۵۰ سال پیش در استرالیا سندروم ناباروری دایمی یا موقت در بین گوسفندان چرا کننده از مزارع شبدر که حاوی میزان بالایی از فیتواستروژن‌های ایزوفلاونوئید بود، گزارش شد (۸ و ۱). شبدر قرمز به عنوان گیاهی چند ساله است و به علت سازگاری در دامنه وسیعی از خاک‌ها

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه پیام نور کرمانشاه انجام شد، در این تحقیق به ترتیب از تعداد ۱۰ و ۲۰ سر موش سوری نر و ماده از نژاد بالبسی و با سن ۹۰-۸۵ روزه با وزن ۲۵ تا ۳۳ گرم که از مرکز پرورش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تهیه شده بودند استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های پلاستیکی استاندارد در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت 5 ± 50 درصد و دمای 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. هر موش نر با دو موش ماده هم‌قفس شده و در صبح روز بعد در صورت مشاهده حضور اسپرم در بررسی اسمیر واژینال به عنوان روز اول حاملگی ثبت شد. موش‌های حامله به طور تصادفی به ۵ گروه ۴ تایی شامل؛ کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (روغن کنجد) و سه گروه تجربی دریافت کننده فورمونونین با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. کلیه تجویزها از روز ۷ آبستنی تا پایان بارداری به صورت داخل صفاقی به موش‌های حامله انجام شد. دوزهای مورد استفاده بر مبنای مطالعه قبلی با اندک تغییری استفاده شدند (۱۰).

شبدر قرمز پس از جمع‌آوری از مزارع استان کرمانشاه و تأیید گیاه‌شناس در سایه خشک گردید. حدود ۱۵ کیلوگرم نمونه خشک شده برای مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۸۰ درصد خوابانده شد و سپس برای مدت ۴ ساعت جوشانده شد. محصول حاصل

پس از سرد شدن با استفاده از صافی فیلتر شد. در ادامه از محصول فیلتر شده با استفاده از اتر استیک استخراج به دست آمد. حدود ۳۰ گرم از محصول حاصل در متانول حل شد و سپس با سیلیکا ژل مخلوط گردید. در ادامه در سیلیکا ژل با شیب شستشوی با کلروفرم و متانول (از ۱:۱۰۰ تا ۱:۱) شستشو داده شد. سپس از کروماتوگرافی لایه نازک برای جداسازی ترکیب استفاده شد. رسوب حاصل مجدداً با سیلیکا ژل تصفیه و شستشو گردید و حدود ۵ گرم فورمونونین سفید رنگ پس از تبلور مجدد به دست آمد (۱۰).

مراحل مختلف آزمایش مطابق با آیین نامه اخلاق زیستی دانشگاه پیام نور و با تأیید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی با کد اخلاق (IR.PNU.REC.1397.013) انجام گرفت.

پس از زایمان، تمامی زاده‌ها جهت بررسی سلامتی حیوانات روزانه وزن شدند. زاده‌ها در روز ۲۱ پس از تولد از شیر مادر محروم شدند و سپس از هر مادر ۳ یا ۴ فرزند با جنس ماده به طور تصادفی انتخاب شد. در مجموع تعداد هفتاد زاده جنس ماده جهت بررسی‌های بعدی در دو مجموعه قرار گرفتند. در مجموعه اول در هر زیرگروه تعداد ۸ سر موش مطابق با گروه‌بندی مادر قرار گرفته و جهت بررسی شروع بلوغ، چرخه استروس، وزن اندام‌های تولیدمثلی، شمارش جسم زرد تخمدان و ارزیابی هورمونی مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموعه دوم نیز مطابق با گروه‌بندی مادر در هر زیر گروه تعداد ۶

پوششی شاخی شده بدون هسته مشخص می‌شود. مرحله مت استروس، که در این مرحله مخلوطی از انواع سلول‌ها شامل؛ لوکوسیت‌ها، سلول‌های پوششی هسته‌دار و سلول‌های پوششی شاخی شده مشاهده می‌شود. مرحله دی استروس، که در این مرحله لوکوسیت‌ها غالب هستند (۱۵-۱۳). همین‌طور شاخص دی استروس (Diestrus index) به صورت زیر محاسبه و ثبت شد (۱۵):

$$100 \times \frac{\text{تعداد روزهای با اسمیر دی استروس}}{\text{تعداد کل روزهای بررسی اسمیر واژن}}$$

موش‌های مجموعه اول با تجویز کتامین/زایلازین (شرکت آلفاسن هلند) در مرحله دی استروس در حدود روز ۸۰ پس از تولد عمیقاً بی‌هوش شده و بلافاصله شکم حیوانات باز شد. ابتدا خون آنها از قلب جدا شد. پس از لخته شدن خون، پلاسما با سانتریفیوژ جداسازی و در دمای ۷۰- تا زمان سنجش هورمونی نگهداری شد. در ادامه تخمدان‌ها و رحم خارج شده و پس از وزن شدن با استفاده از ترازوی دیجیتال (Sartorius، آلمان)، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد برای مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند.

اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های استرادیول و لوتئینی (LH) با روش سنجش ایمنی رادیواکتیو (RIA) مطابق با پروتوکول کیت‌های مربوطه (رادیم، ایتالیا) انجام گرفت.

موش‌های ماده ۸۰ روزه در هر گروه برای بررسی رفتار لوردوز به طور تصادفی انتخاب شدند.

موش از موش‌های ماده باقی مانده قرار گرفته و تا روز ۸۰ پس از تولد جهت بررسی رفتار جنسی (لوردوز) نگهداری شدند.

موش‌ها از روز ۲۴ پس از تولد روزانه جهت مشاهده بازشدگی واژن بررسی شدند. در جوندگان آغاز بلوغ به وسیله بازشدن واژن به عنوان یک نشانه مناسب فعال شدن محور هیپوتالاموس - هیپوفیز گناد (HPG) تعیین می‌گردد که در حدود ۵ هفته پس از تولد در موش‌های آزمایشگاهی با مشاهده چشمی به وجود آمدن یک شکاف طولی در واژن موش‌ها تعیین می‌شود (۱۴ و ۱۳).

اولین استروس در موش‌ها با ظهور سلول‌های شاخی شده در اسمیر واژن در حدود ۲ تا ۱۰ روز پس از مشاهده بازشدن واژن اتفاق می‌افتد. پس از مشاهده اولین استروس، چرخه استروس به صورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مشاهده اسمیر واژن برای مدت ۳۰ روز بررسی شد. به طور خلاصه، اسمیرهای واژن از موش‌های ماده با استفاده از سواپ آغشته با محلول NaCl ۹ درصد به دست آمد و بر روی لام شیشیه‌ای تمیز گسترش تهیه شد و با رنگ متیلن بلو (سیگما) ۱ درصد رنگ‌آمیزی شد و سپس تحت میکروسکوپ نوری (Olympus Bx51، ژاپن) مشاهده انجام شد. چرخه استروس کامل در موش‌ها ظرف مدت ۴ تا ۵ روز اتفاق افتاده و به ۴ مرحله به صورت زیر تقسیم می‌شود؛ مرحله پرواستروس، که در طی آن سلول‌های پوششی هسته‌دار غالب هستند. مرحله استروس، این مرحله با حضور سلول‌های

فاکتور لوردوز (LQ) در آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد ۴۰ سانتی‌متر طول، ۳۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۲۵ سانتی‌متر عرض که کف آن با خاک اره پوشیده شده بود بررسی شد. در ابتدای هر تست، یک موش نر همسن و هم‌نژاد با موش‌های ماده که قابلیت باروری آن قبلاً به اثبات رسیده بود، به تنهایی در کنار یک موش ماده قرار می‌گرفت. در ادامه پاسخ‌های لوردوز (وضعیت موش ماده جهت پذیرش موش نر) موش ماده نسبت به تعداد مونت (سوار شدن موش نر بر موش ماده) موش نر ثبت گردید. تست تا زمان انجام ۱۰ مونت به طول کشید. تست برای مدت ۳ روز متوالی در ساعت ۹ شب انجام شد و میانگین ثبت گردید و در نهایت LQ با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (۱۶ و ۱۷).

$$\text{فاکتور لوردوز (LQ)} = \frac{\text{تعداد پاسخ لوردوز موش ماده}}{\text{تعداد مونت موش نر}} \times 100$$

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کولموگروف اسمیرنوف، آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میانگین روز باز شدن واژن در موش‌های گروه کنترل و شاهد به ترتیب ۳۲/۸۷ و ۳۳/۱۲ روز پس از تولد بود و این مقدار در گروه‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ فورمونوتین به ترتیب ۳۲/۶۲، ۳۲/۲۵ و ۳۰/۸۷ روز پس از تولد بود. باز شدن واژن به طور معنی‌داری در گروه ۵۰۰ فورمونوتین ($p < 0/01$).

سریع‌تر از گروه کنترل مشاهده گردید و در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (نمودار الف). همچنین میانگین اولین استروس مشاهده شده در موش‌های گروه کنترل و شاهد به ترتیب ۴۱/۱۲ و ۴۰/۲۵ پس از تولد بود و این مقدار در گروه‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ فورمونوتین به ترتیب ۴۰/۸۷، ۴۳/۸۷ و ۴۴/۱۲ روز پس از تولد بود. اولین استروس به طور معنی‌داری در گروه‌های ۵۰ ($p < 0/01$) و ۵۰۰ فورمونوتین ($p < 0/01$) در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های شاهد و ۵ فورمونوتین با تأخیر مشاهده گردید. اختلاف بین گروه‌های شاهد و ۵ فورمونوتین با گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ب).

بررسی چرخه‌های استروس در موش‌ها نشان داد که تعداد آن در گروه ۵۰۰ فورمونوتین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($p < 0/05$) داشته است، در صورتی که کاهش تعداد چرخه‌های استروس در گروه‌های ۵ ($p = 0/691$) و ۵۰ فورمونوتین ($p = 0/864$) معنی‌دار نبودند. همین‌طور در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونوتین با یکدیگر اختلافی مشاهده نشد. بررسی چرخه‌ها همین‌طور نشان داد که میانگین طول مدت آن در گروه ۵۰۰ فورمونوتین ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت و در گروه‌های ۵ ($p = 0/907$) و ۵۰ فورمونوتین ($p = 0/849$)، افزایش این مقدار معنی‌دار نبود. در همین ارتباط در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونوتین با یکدیگر اختلافی

فورمونونتین به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان داد که این کاهش معنی‌دار نبود ($p=0/151$). در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونونتین با یکدیگر، تعداد جسم زرد در گروه ۵۰۰ در مقایسه با ۵ فورمونونتین به طور معنی‌دار ($p<0/01$) کاهش یافت. کاهش تعداد جسم زرد در گروه ۵۰ در مقایسه با گروه ۵ فورمونونتین کاهش یافت، اما معنی‌دار نبود (جدول ۲).

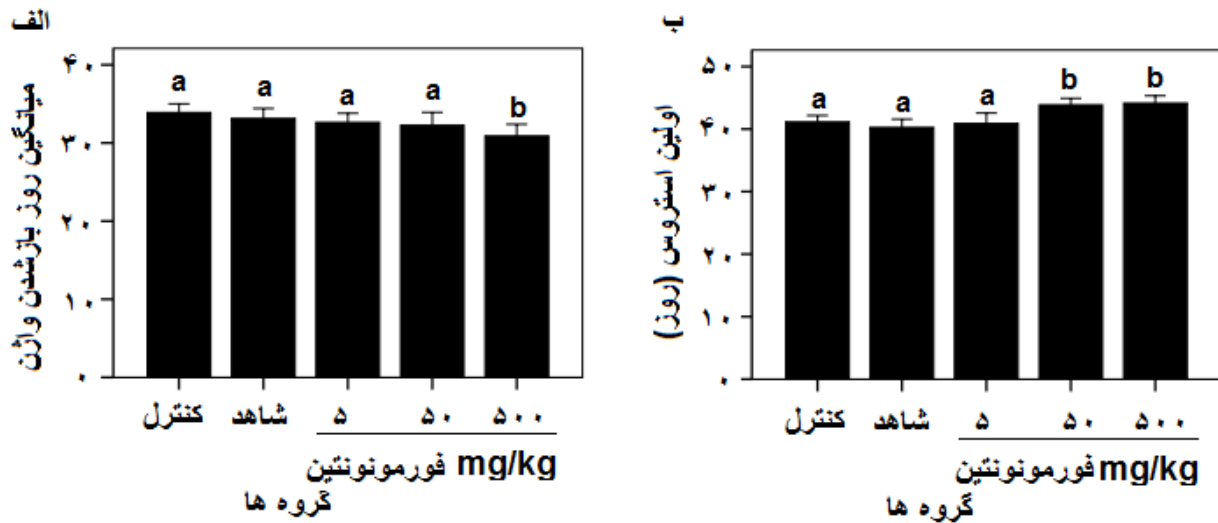
غلظت استرادیول در گروه‌های ۵۰ ($p<0/01$) و ۵۰۰ ($p<0/001$) فورمونونتین به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. غلظت استرادیول در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه ۵ فورمونونتین افزایش یافت (شکل ۲ الف). غلظت هورمون LH به طور معنی‌داری در گروه ۵۰۰ ($p<0/001$) فورمونونتین به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. همین‌طور غلظت هورمون LH در گروه‌های ۵ ($p=0/658$) و ۵۰ ($p=0/053$) فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت که این کاهش معنی‌دار نبود. غلظت هورمون LH در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه ۵ فورمونونتین و گروه ۵۰۰ در مقایسه با گروه ۵ فورمونونتین کاهش یافت (نمودار ۲ ب).

درصد رفتار لوردوز در گروه ۵۰۰ فورمونونتین به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و شاهد ($p<0/001$) کاهش نشان داد. همین‌طور در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونونتین با یکدیگر، رفتار لوردوز به طور معنی‌داری در گروه ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه‌های ۵ و ۵۰ فورمونونتین ($p<0/01$) کاهش یافت (نمودار ۳).

مشاهده نشد. میانگین شاخص دی‌استروس در گروه‌های ۵۰ ($p<0/05$) و ۵۰۰ ($p<0/01$) فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. در گروه ۵ فورمونونتین ($p=0/167$) نیز میانگین شاخص دی‌استروس در مقایسه با گروه افزایش یافت که معنی‌دار نبود. همین‌طور در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونونتین با یکدیگر اختلافی مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۲ نتایج تأثیر تیمار نوزادی فورمونونتین را بر وزن اندام‌های تولیدمثلی تخمدان و رحم در موش‌های ۷۰ روزه نشان می‌دهد. بررسی وزن بدن تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف با یکدیگر و با گروه کنترل مشاهده نشد (نتایج وزن بدن نشان داده نشده‌اند). وزن تخمدان نسبت به وزن بدن به طور معنی‌داری در گروه ۵۰۰ فورمونونتین ($p<0/01$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، در صورتی که وزن رحم نسبت به وزن بدن به طور معنی‌داری در گروه‌های ۵۰ ($p<0/01$) و ۵۰۰ فورمونونتین ($p<0/001$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. در این مورد در مقایسه بین گروه‌های مختلف فورمونونتین با یکدیگر، وزن تخمدان نسبت به وزن بدن در گروه ۵ در مقایسه با ۵۰۰ فورمونونتین به طور معنی‌دار کاهش یافت و وزن رحم نسبت به وزن بدن افزایش یافت.

تعداد جسم زرد در گروه ۵۰۰ فورمونونتین به طور معنی‌داری ($p<0/05$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد. همین‌طور این مقدار در گروه ۵۰



نمودار ۱: تأثیر تجویز فورموننتین در دوره حاملگی بر روز باز شدن واژن (الف) و آغاز اولین استروس (ب) در موش‌های سوری. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد، تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

جدول ۱: تأثیر تجویز فورموننتین در دوره حاملگی بر چرخه استروس

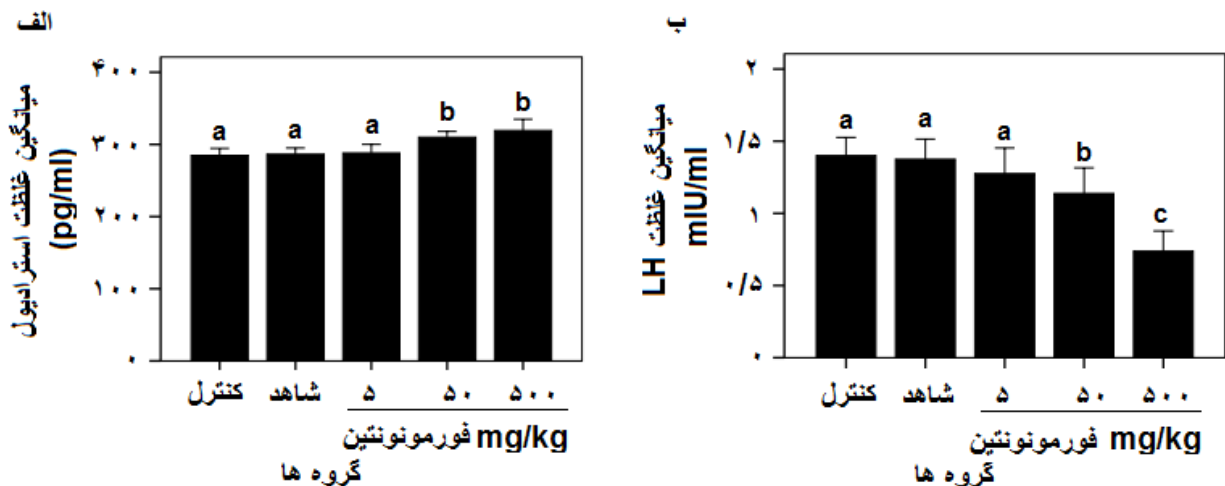
گروه‌ها	تعداد چرخه‌های استروس	طول مدت چرخه‌های استروس	شاخص دی استروس
کنترل	۶/۴۴ \pm ۰/۴۹ ^a	۴/۶۹ \pm ۰/۳۷ ^a	۴۲/۵۰ \pm ۰/۳۵ ^a
شاهد	۶/۳۱ \pm ۰/۵۳ ^a	۴/۴۸ \pm ۰/۵۲ ^a	۴۳/۵۰ \pm ۰/۴۷ ^a
۵ فورموننتین	۵/۹۴ \pm ۰/۶۸ ^{ab}	۵/۰۶ \pm ۰/۶۸ ^{ab}	۴۷/۱۲ \pm ۰/۵۰ ^{ab}
۵۰ فورموننتین	۶/۰۶ \pm ۱/۰۸ ^{ab}	۵/۱۲ \pm ۱/۰۱ ^{ab}	۴۹/۲۵ \pm ۰/۲۶ ^b
۵۰۰ فورموننتین	۵/۲۵ \pm ۰/۸۹ ^b	۵/۱۰ \pm ۰/۹۴ ^b	۵۰/۵۰ \pm ۰/۳۶ ^b

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

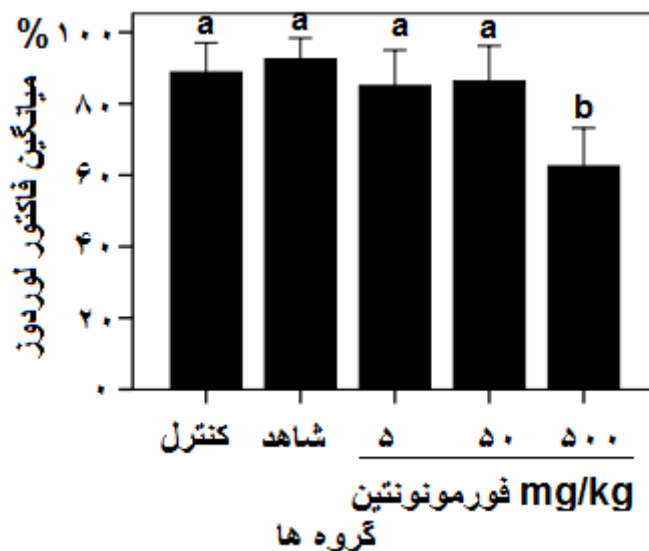
جدول ۲: تأثیر تجویز فورموننتین در دوره حاملگی بر وزن اندام‌های جنسی و تعداد جسم زرد

گروه‌ها	وزن رحم	وزن تخمدان	تعداد جسم زرد
کنترل	۵۸۰/۱۳ \pm ۲۱/۱۰ ^a	۷۴/۶۲ \pm ۵/۳۶ ^a	۲۸/۷۵ \pm ۲/۵۷ ^a
شاهد	۵۸۳/۹۶ \pm ۳۹/۲۵ ^a	۷۶/۲۱ \pm ۶/۳۰ ^a	۴۰/۷۵ \pm ۴/۳۷ ^a
۵ فورموننتین	۶۰۷/۷۰ \pm ۲۳/۹۸ ^{ac}	۷۵/۱۱ \pm ۶/۳۶ ^a	۳۹/۸۷ \pm ۳/۳۶ ^a
۵۰ فورموننتین	۶۷۰/۳۲ \pm ۶۵/۶۳ ^{bc}	۷۰/۰۸ \pm ۶/۹۱ ^{ac}	۳۳/۵۰ \pm ۴/۰۳ ^{ac}
۵۰۰ فورموننتین	۷۰۶/۶۸ \pm ۶۵/۲۹ ^b	۶۲/۲۲ \pm ۷/۴۱ ^{bc}	۳۱/۸۷ \pm ۶/۲۹ ^{bc}

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



نمودار ۲: تأثیر تجویز فورمونونتین در دوره حاملگی بر غلظت هورمونهای استرادیول (الف) و LH (ب) در موشهای سوری ماده. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. تعداد موشها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



نمودار ۳: تأثیر تجویز فورمونونتین در دوره حاملگی بر رفتار جنسی لوردوز در موش‌های سوری ماده. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. تعداد موشها در هر گروه ۶ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

می‌باشد (۳-۵)، لذا هدف از این بررسی اثرات فیتواستروژن فورمونونتین به دست آمده از شبدر قرمز در طی حاملگی موش‌ها بر آغاز بلوغ، چرخه استروس، وزن اندام‌های تناسلی و رفتار لوردوز فرزندان آنها بود.

بحث

شواهد روزافزون نشان می‌دهند که مصرف فیتواستروژن‌های خوراکی در دوره‌های حساس هورمونی بویژه دوره نوزادی دارای اثرات سوئی بر بلوغ و فیزیولوژی دستگاه تولیدمثل در بزرگسالی

شواهد مطالعه حاضر حکایت از آن دارد که مواجهه موش‌های حامله با فورموننتین موجب تغییرات معنی‌دار در شاخص‌های مختلف تولیدمثلی موش‌های ماده از جمله؛ بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس، افزایش وزن رحم، کاهش وزن تخمدان، تغییرات هورمونی و کاهش رفتار لوردوز در فرزندان آنها می‌شود.

بازشدن واژن در گروه ۵۰۰ فورموننتین سریع‌تر اتفاق افتاد و اولین استروس در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ فورموننتین با تأخیر بیشتری مشاهده گردید. تسریع در بازشدن واژن نشان دهنده بلوغ زودرس در این موش‌ها می‌باشد. بازشدن واژن یک واقعه مرتبط به آپوپتوز می‌باشد که به عنوان یک نشانه خارجی آغاز بلوغ در جوندگان می‌باشد. این پدیده در شروع بلوغ به علت افزایش سطح هورمون استرادیول سرم اتفاق می‌افتد و با تجویز استرادیول به موش‌های نابالغ سریع‌تر از حالت طبیعی اتفاق می‌افتد. به طور طبیعی بازشدن واژن تقریباً ۱۰ روز قبل از شروع چرخه استروس و اولین استروس اتفاق می‌افتد (۱۳). تعیین سن آغاز بلوغ با استفاده از نشانه بازشدن واژن در جوندگان ماده در آزمون‌های توکسیکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه تفاوت‌هایی بین نژادها یا کولونی‌های موش‌ها در پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بازشدن واژن یک نشانه اصلی آغاز سن بلوغ در جوندگان ماده می‌باشد و معمولاً در موش‌های ۳۰ تا ۳۷ روزه اتفاق می‌افتد، مشاهده می‌گردد. افزایش سطح استروژن‌ها یا ترکیبات شبه

استروژنی نقش اصلی و تعیین کننده‌ای در تغییرات فیزیولوژیکی بازشدن واژن دارند (۱۶ و ۱۷). در دو مطالعه مختلف به وسیله کوکی و همکاران نشان دادند که تیمار نوزادی با فیتواستروژن‌های جنیستین (۱۶) و کامسترول (۱۷) منجر به افزایش سرعت بازشدن واژن و در نتیجه بلوغ زودرس در رت‌های ماده می‌شود که تأیید کننده مطالعه حاضر می‌باشد. بنابراین افزایش سطح استرادیول در این مطالعه ممکن است دلیل بلوغ زودرس در موش‌های ماده باشد.

تیمار نوزادی جنیستین و کامسترول در پژوهش‌های قبلی (۱۷ و ۱۶) منجر به ایجاد اختلال در چرخه استروس گردید که در موش‌های مطالعه حاضر نیز با کاهش تعداد چرخه، افزایش طول مدت چرخه و افزایش شاخص دی استروس چرخه استروس دچار اختلال شدند. در مطالعات کوکی و همکاران (۱۷ و ۱۶) پیشنهاد شد که جنیستین و کامسترول مشابه با استروژن در تمایز جنسیتی مغز در دوره حساس نوزادی عمل کرده و باعث ماده‌زدایی مغز در تنظیم چرخه استروس می‌گردد. کاهش غلظت LH در مطالعه حاضر می‌تواند نشانه این اختلال نورواندوکرینی باشد. همین‌طور کاهش تعداد جسم زرد که در این مطالعه مشاهده شد، می‌تواند به طور مستقیم ناشی از کاهش غلظت LH و اختلال نورواندوکرینی باشد.

در این مطالعه، در موش‌های تحت درمان با فورموننتین وزن تخمدان در گروه ۵۰۰ کاهش یافت و وزن رحم در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ افزایش یافت. این

قبلی با ترکیبات استروژنیک دیگر از جمله بیسفنول آ (۲۴ و ۲۳)، جنیستین و کامسترویل می‌باشد (۱۷ و ۱۶). هسته VMH از لحاظ مورفولوژی نوروئهای موجود، یک هسته دیمورفیک جنسی می‌باشد که ماده‌سازی (Feminization) مغز در این هسته در حضور اندک استرادیول صورت می‌گیرد و افزایش غلظت استرادیول یا ترکیبات شبه استروژن منجر به ماده‌زدایی (نرینه شدن) مغز می‌شوند (۲۵). شواهد نشان داده‌اند که طی دوره بحرانی تمایز جنسیتی مغز در اواخر جنینی و اوایل تولد در جوندگان، استرادیول فعالسازی کیناز P13 را افزایش می‌دهد که خود منجر به فعالسازی آبخاری از وقایع درون سلولی می‌شود که در نهایت منجر به ماده‌زدایی هسته VMH شده و در نتیجه باعث کاهش یا از بین رفتن رفتار لوردوز در جوندگان ماده می‌شود (۲۶).

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی و استریولوژیک در هسته‌های مغزی کنترل کننده محور تولید مثل از جمله VMH اشاره کرد که انجام آن در پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

بنابراین فورمونونتین به دلیل اثرات شبه استروژنی ممکن است شبیه استرادیول در دوره بحرانی هورمونی عمل کرده و از تشکیل صحیح مدارهای نورونی هسته‌های کنترل کننده عملکرد

نتایج ممکن است به دلیل بهم خوردن تعادل هورمونی در مطالعه حاضر باشد. شواهد نشان داده‌اند که وزن تخمدان و تعداد جسم زرد به سطح گنادوتروپین‌ها به ویژه هورمون LH و متابولیسم، وزن و رشد رحم به هورمون استرادیول بستگی دارد (۱۹ و ۱۸) که با توجه به کاهش LH و افزایش استرادیول در مطالعه حاضر همخوانی دارد. مشاهدات مشابه در جوندگان تحت درمان با ترکیبات شبه استروژن مشاهده شده است (۲۱ و ۲۰، ۱۶، ۱۴).

در این مطالعه کاهش فاکتور لوردوز در گروه با دوز ۵۰۰ فورمونونتین مشاهده شد. شواهد نشان داده‌اند که هسته هیپوتالاموسی شکمی میانی (Ventromedial nucleus of the hypothalamus = VMH)، رفتار جنسی در جوندگان ماده را کنترل می‌کند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که آسیب به این هسته منجر به کاهش یا از بین رفتن این رفتار در جوندگان می‌گردد و تجویز هورمون استرادیول به طور مستقیم به این هسته باعث بروز این رفتار می‌گردد. در این هسته، نوروئها به میزان زیادی گیرنده‌های استرادیول را بیان می‌کنند. آپوپتوز نوروئها و در نتیجه ماده‌زدایی (defeminization) مغز در طی دوره تکوین یک فرآیند وابسته به استرادیول است که از تشکیل مدارهای نورونی جنس ماده به طور طبیعی جلوگیری کرده و منجر به کاهش یا سرکوب رفتار جنسی ماده می‌گردد (۲۲). مشاهده کاهش فاکتور لوردوز در مطالعه کنونی در توافق با پژوهش‌های

توليدمثلي ممانعت به عمل آورده و در نتيجه منجر به
اختلال در عملکرد توليدمثلي و کاهش رفتار توليدمثلي
در موش‌هاي سوري جنس ماده شود.

تقدير و تشكر

اين مقاله حاصل طرح پژوهشي به شماره
۴۴۴۸/د/۱۱۱۱/۲۳ دانشگاه پيام نور استان کرمانشاه
مي‌باشد، که با حمايت اين دانشگاه انجام شد، بدین
وسيله از معاونت محترم پژوهشي آن دانشگاه تشكر
و قدرداني مي‌گردد.

REFERENCES

1. Mostrom M, Evans TJ. Phytoestrogens. In: Gupta RC (editor). Reproductive and Developmental Toxicology. 1nd ed. San Diego: Academic Press; 2011; 707-22.
2. Moutsatsou P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens)* 2007; 6(3): 173-93.
3. Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*. 2012; 143(3): 247-60.
4. Tena-Sempere M. The Kisspeptin system as putative target for endocrine disruption of puberty and reproductive health. In: Bourguignon JP, Jegou B, Kerdelhue B, Toppari J, Christen Y (editors). *Multi-System Endocrine Disruption*. 1nd ed. Springer; Berlin Heidelberg: 2011; 23-41.
5. Chen N, Aleksa K, Woodland C, Rieder M, Koren G. Ontogeny of drug elimination by the human kidney. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 160-68.
6. Willoughby KN, Sarkar AJ, Boyadjieva NI, Sarkar DK. Neonatally administered tert-octylphenol affects onset of puberty and reproductive development in female rats. *Endocrine* 2005; 26(2): 161-8.
7. Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, Ozimina-Kamińska E, Taranowicz J, Siwek A. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 457052.
8. Adams NR. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208(1): 87-91.
9. Pourmoradi S, Jafari AA. Evaluation of herbage yield and quality in varieties of red clover cultivated in rangelands of Mazandaran province, Iran. *Iranian Journal of Range and Desert Research* 2015; 22(1): 121-30.
10. Mu H, Bai YH, Wang ST, Zhu ZM, Zhang YW. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine* 2009; 16(4): 314-9.
11. Gautam J, Khedgikar V, Kushwaha P, Choudhary D, Nagar GK, Dev K, et al. Formononetin, an isoflavone, activates AMP-activated protein kinase/ β -catenin signalling to inhibit adipogenesis and rescues C57BL/6 mice from high-fat diet-induced obesity and bone loss. *Br J Nutr* 2017; 117(5): 645-61.
12. Li S, Dang Y, Zhou X, Huang B, Huang X, Zhang Z, et al. Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway. *Sci Rep* 2015; 5: 16815.
13. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009; Appendix 4: Appendix 41.
14. parandin r, behnam-rassouli m, mahdavi-shahri n. effects of neonatal exposure to zearalenone on puberty timing, hypothalamic nuclei of avpv and arc, and reproductive functions in female mice. *Reprod Sci* 2017; 24(9): 1293-303.
15. Ksheerasagar RL, Kaliwal BB. Effects of carbosulfan administration schedules on estrous cycle and follicular dynamics in albino mice. *Ind Health* 2008 46(3): 210-6.
16. Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K. Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Horm Behav* 2003; 44(2): 140-5.
17. Kouki T, Okamoto M, Wada S, Kishitake M, Yamanouchi K. Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. *Brain Res Bull* 2005; 64(5): 449-54.
18. Chattopadhyay S, Ghosh SP, Ghosh D, Debnath J. Effect of dietary co-administration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. *Toxicol Sci* 2003; 75: 412-22.
19. Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kim TS, Kang IH, Seok JH, Kim IY, Park KL, Han SY. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci* 2002; 67(1): 52-62.
20. Singh S, Lata S. Low dose effect of in-utero exposure to genistein on reproduction of female mouse. *Indian J Sci Res* 2014; 9(1): 039-46.
21. Nah WH, Park MJ, Gye MC. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin Exp Reprod Med* 2011; 38(2): 75-81.
22. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 2008; 88: 91-124.

23. Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci* 2010; 114(1): 133-48.
24. Naulé L, Picot M, Martini M, Parmentier C, Hardin-Pouzet H, Keller M, Franceschini I, Mhaouty-Kodja S. Neuroendocrine and behavioral effects of maternal exposure to oral bisphenol A in female mice. *J Endocrinol* 2014; 10; 220(3): 375-88.
25. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 2008; 88(1): 91-124.
26. Schwarz JM. Sex and the Developing Brain. In: Shansky RM (editor). *Sex differences in the central nervous system*. 1st ed. Mica Haley: Academic Press; 2015; 221-45.

The effects of Formononetin Derived from Red Clover During Pregnancy on Puberty, Some Reproductive Parameters and Lordosis Behavior of Female Mice

Parandin R*, Mohammadi L

Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 30 July 2018 Accepted: 21 Jan 2019

Abstract

Background & aim: Formostontin is a non-steroidal phytoestrogenic polyphenolic plant with estrogen-like properties found in some plants, including red clover. The aim of the present study was to determine the effects of formostontin during pregnancy on the onset of puberty, estrus cycle, genital weights and their children's lordosis behavior.

Methods: In the present experimental study, twenty pregnant mice were randomly divided into 5 groups: control (non-treated), control (sesame oil) and the three experimental groups receiving formonotonin at doses of 5, 50 and 500 mg / kg body weight. . All of the prescriptions were administered intraperitoneally to pregnant mice from the 7th day of pregnancy to the end of pregnancy. Female children (6-8 = number) were examined for vaginal opening, estrus cycle, reproductive organs weight and lordosis behavior. Data were analyzed using Kolmogrov-Smirnov statistical tests, one way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: The vaginal opening days were significantly higher in the 500 mg of formonotonin ($p < 0.01$). The first estrus was significantly delayed in groups 50 ($p < 0.05$) and 500 ($p < 0.01$). A reduction in the number of estrous cycles and an increase in the duration of the estrous cycle was observed in group 500 ($p < 0.05$) and diastereic index increased in groups 50 ($p < 0.05$) and 500 ($p < 0.01$). Reduction in ovarian weight and reduction in the number of flesh in group 500 ($p < 0.05$) and uterine weight gain ($p < 0.05$) were observed in groups 50 and 500. In addition, increased concentrations of estradiol were observed in the groups 50 ($p < 0.05$) and 500 ($p < 0.001$), and LH level and lordosis reduction in group 500 ($p < 0.001$) in comparison to the control group.

Conclusion: The results of the present study indicated that the exposure of pregnant mice with Formentontin resulted in premature puberty, estrus cycle disorder, weight loss in sexual organs, and decreased sexual behavior in offspring of their female sex.

Keywords: Formostontin, Phytoestrogens, Reproduction, Ovarian.

*Corresponding author: Parandin R, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
Email: rahmatparandin@pnu.ac.ir

Please cite this article as follows:

Parandin R, Mohammadi L. The effects of Formononetin Derived from Red Clover During Pregnancy on Puberty, Some Reproductive Parameters and Lordosis Behavior of Female Mice. Armaghane-danesh 2019; 24(1): 199-213