Archive of SID

مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیستم، شماره‌ی ۶، صفحه‌های ۳۵۵ ـ ۳۴۴ (بهمن ـ اسفند ۱۳۹۷)

مقاله‌ی پژوهشی

# اثرات تجویز فورمونونتین حاصل از شبدر قرمز در دوره نوزادی بر برخی شاخص‌های دو شکلی جنسی موش‌های کوچک آزمایشگاهی

دکتر رحمت اله پرندین، لیلی محمدی

دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** تهران، بزرگراه ارتش، خیابان نخل، سازمان مرکزی دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دکتر رحمت‌اله پرندین؛
e-mail:rahmatparandin@pnu.ac.ir

## چکیده

**مقدمه: فورمونونتین، یک فیتواستروژن موجود در گیاهانی مثل شبدر قرمز است که ساختمان شیمیایی مشابه استرادیول دارد. هدف این مطالعه بررسی مواجهه فورمونونتین حاصل از شبدر قرمز در دوره نوزادی بر شاخص‌های دوشکلی جنسی موش بود. مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، نوزادان نر و ماده موش‌های کوچک آزمایشگاهی به‌طور تصادفی (n=۸) به گروه-های کنترل، شاهد و فورمونونتین با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت زیرجلدی در روزهای ۱ تا ۵ پس از تولد تقسیم شدند. پس از بررسی سن آغاز بلوغ، شاخص‌های چرخه‌ی استروس، فاصله آنوژنیتال، رفتار جنسی، ترجیح ساخارین و هورمون‌های جنسی بررسی شدند. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معناداری p<۰/۰۵ تحلیل شدند. یافته‌ها: در موش‌های ماده گروه ۵۰۰ فورمونونتین (p<۰/۰۱) بلوغ زودرس و در موش‌های نر گروه-های ۵۰ (p<۰/۰۵) و ۵۰۰ فورمونونتین (p<۰/۰۱) بلوغ با تاخیر اتفاق افتاد. میانگین مدت چرخه‌ی استروس در گروه ۵۰۰ (p<۰/۰۵) افزایش یافت. فاکتور لوردوز موش‌های ماده و تعداد مونت موش‌های نر کاهش یافته (p<۰/۰۰۱) و مدت زمان سپری شده تا انجام اولین مونت موش‌های نر گروه ۵۰۰ فورمونونتین (p<۰/۰۰۱) افزایش یافت. درصد ترجیح ساخارین موش‌های ماده گروه‌های ۵۰ (p<۰/۰۵) و ۵۰۰ فورمونونتین (p<۰/۰۱) کاهش یافت. به علاوه افزایش غلظت استرادیول گروه‌های ۵۰ (p<۰/۰۱) و ۵۰۰ (p<۰/۰۰۱) و کاهش غلظت تستوسترون در گروه ۵۰۰ فورمونونتین (p<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز فورمونونتین در دوره نوزادی موش‌ها می‌تواند منجر به ایجاد شاخص‌ها و رفتارهای دوشکلی جنسی گردد.**

**واژگان کلیدی:** فورمونونتین، دوشکلی جنسی، استروژن، موش کوچک آزمایشگاهی

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۸- دریافت اصلاحیه: ۹۷/۱۲/۱۷ ـ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۲۱

## مقدمه

فیتواستروژن‌ها، ترکیبات پلی‌فنولیک و غیراستروئیدی گیاهی هستند که دارای ساختار مشابه با استروژن‌های پستانداران به‌ویژه هورمون استرادیول بوده و توانایی تحریک یا مهار گیرنده‌های استروژن را دارند. فیتواستروژن‌ها در برخی منابع غذایی گیاه‌خواران به وفور یافت می‌شوند. مطالعات مختلف، اثرات سودمند فیتواستروژن‌ها را بر برخی جنبه‌های سلامت عمومی بدن از جمله در سیستم قلبی-عروقی، سیستم ایمنی، پوکی استخوان[i]، رگ سازی[ii]، دیابت و وازوموتور[iii] نشان داده‌اند. به علاوه خواص آنتی‌اکسیدانتی، ضد سرطانی[iv]، ضدالتهابی و پروبیوتیک این ترکیبات نیز گزارش شده است.[۱،۲] با این-حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که فیتواستروژن‌ها به عنوان جزئی از ترکیبات مداخله‌گر اندوکرینی[v] قادر به مداخله در رشد و تکوین سیستم نوروآندوکرین[vi] هستند.

i -Osteoporosis
ii -Angiogenesis
iii -Vasomotor
iv -Antineoplastic
v - Endocrine disrupting compounds
vi-Neuroendocrine system

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

هم‌اکنون اختلالات تولیدمثلی، رفتاری و سرطان‌های وابسته به هورمون به دنبال مصرف یا مواجهه با فیتواستروژن‌ها در انسان، احشام و جوندگان گزارش شده است.[۱،۳] برخی فیتواستروژن‌ها به‌ویژه ایزوفلاونوئیدها به مقدار قابل توجهی در مکمل‌های غذایی نوزادان یافت می‌شوند یا ممکن است از راه شیر مادر به نوزادان منتقل شوند.[۳] اما یکی از عوارض و نگرانی‌های روزافزون ترکیبات مداخله‌گر اندوکرینی به ویژه فیتواستروژن‌ها، اثرات آن‌ها بر خصوصیات دوشکلی جنسی[i] است که توجه کمتری به آن شده است. درحقیقت هورمون-های جنسی به عنوان مهمترین فاکتورهای اثرگذار بر تفاوت-های جنسی در سازماندهی مغز و مدارهای نوروآندوکرینی در طی دوره‌های اواخر جنینی و اوایل تولد نقش مهمی ایفا می‌کنند. بنابراین هرگونه افزایش یا کاهش هورمون‌های درون‌زاد یا مواجهه با ترکیبات مداخله‌گر اندوکرینی در دوره‌های بحرانی هورمونی، می‌تواند سازماندهی طبیعی مغز و مدارهای نوروآندوکرینی را با اختلال جدی مواجه کرده و بر دوشکلی جنسی اثر بگذارد. تاکنون اثر چند فیتواستروژن بر تکوین مغز و رفتار جنسی در مدل‌های حیوانی بررسی شده است.[۴-۶] به عنوان مثال هسته پره‌اپتیک[ii] در هیپوتالاموس یک ناحیه دوشکلی جنسی است که در جوندگان نر تقریبا ۳ تا ۵ برابر بزرگتر از جوندگان ماده می-باشد. هم‌چنین، هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی[iii] در هیپوتالاموس نیز یک هسته دوشکلی جنسی است که در جوندگان ماده دارای اندازه بزرگتری نسبت به نر می‌باشد و در موج LH (هورمون زردینه‌ساز) پیش از تخمک‌گذاری اهمیت فراوانی دارد. مواجهه موش‌های صحرایی نر در دوره نوزادی با فیتواستروژن رزوراترول[iv] موجب مادینه شدن[v] (نرینه زدایی[vi]) این هسته‌ها ( کاهش حجم هسته پره‌اپتیک و افزایش حجم هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی) و سرکوب رفتار جنسی در بزرگسالی می‌شود.[۷] همین‌طور مواجهه نوزادی جوندگان ماده با فیتواستروژن جنیستین موجب تغییر در حجم این هسته‌ها و تعداد نورون‌های آن و اختلال در رفتارهای جنسی مربوط به هر دو جنس نر و ماده می-گردد.[۶] به‌علاوه تیمار موش‌های صحرایی ماده در دوره نوزادی با فیتواستروژن کامسترول[vii] موجب سرکوب رفتارهای دوشکلی لوردوز و چرخه استروس در بزرگسالی می‌شود.[۸]

ایزوفلاونوئید فورمونونتین یک فیتواستروژن موجود در برگ گیاهانی مثل شبدر قرمز (*Trifolium pratense* L)، و ریشه‌گون و شیرین بیان است که به دلیل ساختمان شیمیایی مشابه استرادیول، توانایی اتصال به گیرنده‌های استروژن را دارد. فورمونونتین به میزان کمتری در گیاهان خوراکی مثل سویا، لوبیا، گل کلم و نخود سبز نیز یافت می‌شود.[۱،۹] شبدر قرمز در نقاط مختلفی از جهان کاشته شده یا به‌طور خودرو پراکندگی داشته و ارزش غذایی زیادی به‌ویژه برای نشخوارکنندگان دارد.[۱۰] در مطالعات پیشین اثرات سودمند مکمل‌های غذایی حاصل از شبدر قرمز بر گر گرفتگی، پوکی-استخوان و سایر عوارض ناشی از یائسگی گزارش شده است.[۱۱] به‌علاوه اثرات ضد میکروبی، کاهش سطح چربی خون، نوروپروتکتیو، آنتی‌اکسیدان و ضد تومور فورمونونتین نشان داده شده است.[۹] در مطالعات دیگری اثرات این ایزوفلاونوئید به عنوان عامل مهار کننده چربی-سازی و کاهش چربی و وزن بدن[۱۲] و هم‌چنین رگ سازی از راه تحریک گیرنده‌های استروژنی[۱۳] بیان شده است. همین-طور بررسی‌های متعدد بر خاصیت استروژنیک فورمونونتین تاکید فراوانی دارند.[۱،۹،۱۱]

با توجه به تاثیرات برخی ترکیبات شبه‌استروژنی در دوره‌های حساس زندگی بر شاخص‌های دوشکلی جنسی و از آن‌جایی که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با اثرات فورمونونتین در این خصوص انجام نشده است، بنابراین مطالعه حاضر بر تیمار نوزادی فورمونونتین و اثرات آن بر برخی مشخصات دوشکلی جنسی در موش‌های جنس نر و ماده بالغ متمرکز گردید.

## مواد و روش‌ها

### تهیه فورمونونتین از شبدر قرمز

پس از جمع‌آوری شبدر قرمز (*Trifolium pratense L*) از مزارع استان کرمانشاه و تایید در آزمایشگاه بیوسیستماتیک گیاهی دانشگاه پیام نور کرمانشاه (کد هرباریومی:۱۳۹۶/۱۱)، در سایه خشک گردید. حدود ۱۵

i - Sexual dimorphic
ii - Preoptic nucleus
iii - Anteroventral periventricular nucleus (AVPV)
iv- Resveratrol
v - Feminization
vi - Demasculinization
vii- Coumestrol

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

کیلوگرم نمونه خشک شده برای مدت ۲٤ ساعت در اتانول ۸۰ درصد قرار گرفت و سپس برای مدت ٤ ساعت جوشانده شد. محصول حاصل پس از سرد شدن با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره۱) فیلتر گردید. در ادامه، محصول فیلتر شده به مدت ۲٤ ساعت در حلال اتیل‌استات خیسانده شد و پس از خشک شدن حدود ۳۰ گرم از محصول به‌دست آمده در متانول حل شد و سپس با سیلیکاژل مخلوط گردید. سیلیکاژل توسط کلروفرم و متانول (با نسبت ۱:۳) شستشو داده شد و از کروماتوگرافی لایه نازک برای جداسازی ترکیب استفاده گردید. رسوب حاصل مجددا با سیلیکاژل تصفیه و شستشو گردید و حدود ٥ گرم فورمونونتین سفید رنگ پس از تبلور مجدد بدست آمد.[۱۱]

**حیوانات، گروه‌بندی و تجویز عصاره**

در این تحقیق به ترتیب از تعداد ۱۰ و ۲۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر و ماده از نژاد BALB/c و حدودا ۳ ماهه با وزن ۲٤ 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/۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت ٥±٥۰ درصد و دمای ۱±۲۲ 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 گردید. پس از زایمان، تمامی زاده‌ها جهت بررسی سلامت، روزانه وزن شدند. در مجموع ۸۰ نوزاد شامل ٤۰ نوزاد نر و ٤۰ نوزاد ماده به‌طور تصادفی به ٥ گروه نر (n=۸) و ٥ گروه ماده (n=۸) و هر جنس شامل گروه‌های کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (روغن کنجد به عنوان حلال فورمونونتین) و سه گروه آزمون دریافت‌کننده فورمونونتین با دوزهای ٥، ٥۰ و ٥۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. کلیه تجویزها از روز ۱ تا ٥ پس از تولد به صورت زیرجلدی و به پشت گردن نوزادان انجام شد. دوزهای مورد استفاده بر مبنای مطالعه پیشین با اندکی تغییر استفاده شدند.[۱۳] مراحل مختلف آزمایش مطابق با آیین نامه اخلاق زیستی دانشگاه پیام نور و با تایید کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی (شناسه اخلاق: IR.PNU.REC.1397.013) انجام گرفت.

**بررسی آغاز بلوغ**

زاده‌ها در روز ۲۱ پس از تولد از شیر مادر محروم شده و جنس‌های نر از ماده جدا شدند. از روز ۲٤ پس از تولد، فرزندان جنس ماده با مشاهده چشمی بازشدن واژن[i] و از روز ۳۳ پس از تولد، فرزندان جنس نر با مشاهده جدایی پوست ختنه‌گاه[ii] جهت تشخیص آغاز سن بلوغ مورد بررسی قرار گرفتند. این دو شاخص خارجی بدن نشان‌دهنده فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و آغاز سن بلوغ جنسی به ترتیب در جوندگان ماده و نر می‌باشند. روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۱ صبح موش‌های ماده از طریق مشاهده چشمی ایجاد شکاف طولی در واژن و در موش‌های نر ایجاد برجستگی تناسلی با استفاده از یک لوپ چشمی بررسی گردید. جدایی پوست ختنه‌گاه با ایجاد انقباض و جمع‌شدگی در ناحیه ختنه‌گاه در نتیجه شاخی‌شدن سلول‌های پوششی این ناحیه به دنبال افزایش تستوسترون در حدود روز ٤۰ پس از تولد اتفاق می‌افتد.[۱٤-۱٦]

**چرخه استروس**

جهت بررسی چرخه استروس، اولین استروس در موش‌ها با مشاهده سلول‌های شاخی‌شده در حدود ۲ تا ۱۰ روز پس از مشاهده بازشدن واژن اتفاق می‌افتد. چرخه استروس به صورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح با مشاهده اسمیر واژن تا ۳۰ روز پس از اولین مشاهده سلول‌های شاخی‌شده بررسی شد. به‌طور خلاصه، اسمیرهای واژن از موش‌های ماده با استفاده از سواپ آغشته با محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد بدست آمد و بر روی لام شیشه‌ای تمیز، گسترش تهیه شده و با رنگ متیلن بلو (شرکت سیگما) ۱ درصد رنگ‌آمیزی و سپس با کمک میکروسکوپ نوری (Olympus Bx51، ژاپن) مشاهده انجام شد. چرخه استروس کامل در موش‌ها ظرف مدت ٤ تا ٥ روز اتفاق افتاده و به ٤ مرحله به صورت زیر تقسیم می‌شود: ۱- مرحله پرواستروس که در طی آن سلول‌های پوششی هسته‌دار غالب هستند. ۲- مرحله استروس؛ این مرحله با حضور سلول‌های پوششی شاخی‌شده بدون هسته مشخص می‌شود. ۳- مرحله متاستروس که در این مرحله مخلوطی از انواع سلول‌ها شامل لوکوسیت‌ها، سلول‌های پوششی هسته‌دار و سلول‌های پوششی شاخی‌شده مشاهده

i - Vaginal opening
ii - Balano-preputial separation

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

مـــی‌گـردد. ٤- مرحلـه دی‌اسـتروس کـه در ایـن مرحلـه لوکوسیت‌ها غالب هستند.[16]

**بررسی فاصله آنوژنیتال**

فاصـله آنوژنیتـال[i] بـه عنـوان یـک شـاخص (دوشـکلی جنسیتی) نرینه سازی[ii]/ماده سازی[iii] که در جونـدگان جـنس نر تقریبا دو برابر جنس ماده می‌باشـد، انـدازه‌گیـری و ثبـت گردید. فاصله آنوژنیتال به صـورت زیـر تعریـف مـی‌شـود: "فاصله بین انتهای قدامی مخرج تا انتهـای خلفـی برجسـتگی تناسلی[iv]" که بـا اسـتفاده از یـک کـولیس در مـوش‌هـای ۷۰ روزه اندازه‌گیری و ثبت شد.[17,18]

**بررسی رفتار جنسی**

رفتار جنسی موش‌های حدودا سه ماهه در آکواریوم شیشه‌ای به ابعاد ٤٠ سانتی‌متر طول، ۳۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۲۵ سانتی‌متر عرض که کف آن با خاک اره پوشیده شده بود بررسی شد.

برای بررسی رفتار جنسی ماده‌ها، هر موش ماده در کنار یک موش نر همنژاد و تقریبا همسن که قابلیت باروری آن قبلا به اثبات رسیده بود، قرار می‌گرفت. در ادامه پاسخ-های لوردوز (وضعیت قوس کمر موش ماده جهت پذیرش جنسی موش نر برای جفت‌گیری) موش ماده نسبت به تعداد مونت (سوارشدن موش نر بر موش ماده جهت انجام جفت-گیری) موش نر ثبت گردید. تست تا زمان انجام ۱۰ مونت به-طول انجامید و برای مدت ۳ روز متوالی در ساعت ۹ شب انجام شد و میانگین ثبت گردید و در نهایت فاکتور لوردوز با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:[16]

$$\text{فاکتور لوردوز} = \frac{\text{تعداد پاسخ لوردوز موش ماده}}{\text{تعداد مونث موش نر}} \times ۱۰۰$$

برای بررسی رفتار جنسی نرها، هر موش نر با یک موش ماده همنژاد و تقریبا همسن که توانایی رفتار جنسی آن قبلا به اثبات رسیده بود، همقفس شده و زمان سپری شده تا انجام اولین مونت و تعداد مونت‌ها در زمان ٤٠ دقیقه برای موش نر ثبت گردید.

**آزمون ترجیح ساخارین (saccharin preference test)**

مقدار مصرف ساخارین (شیرین‌کننده غیرکالریک) یک رفتار دوشکلی جنسی در جوندگان می‌باشد، به‌طوری‌که میزان مصرف آن در موش‌های ماده نسبت به نر بیشتر است. ابتدا به‌منظور عادت‌سازی، موش‌های حدودا ۷۰ روزه برای مدت ٤٨ ساعت علاوه بر غذا به‌جای آب، تنها در معرض بطری حاوی محلول ساخارین ۱ درصد (حل شده در آب شهری) قرار گرفتند. پس از عادت، موش‌ها به مدت ٦ ساعت از مصرف هرگونه نوشیدنی محروم شدند و سپس در معرض استفاده همزمان از هر دو بطری آب شهری و محلول ساخارین ۱ درصد قرار گرفتند. میزان مصرف نوشیدنی برای مدت ٢٤ ساعت در بطری‌ها بر حسب وزن ثبت گردید و مطابق فرمول زیر درصد ترجیح ساخارین برای هر گروه محاسبه شد. [19]

$$\text{درصد ترجیح ساخارین} = \frac{\text{میزان مصرف محلول ساخارین}}{\text{میزان مصرف آب شهری+میزان مصرف محلول ساخارین}} \times ۱۰۰$$

**هورمون سنجی**

ابتدا موش‌های نر و ماده ۳ ماهه (در مرحله دی‌استروس از چرخه جنسی) با کتامین ۱۰ درصد (۸۰ mg/kg) و زایلازین ۲ درصد (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شده، در ادامه شکم حیوانات را باز کرده و خون از بطن چپ قلب با استفاده از سرنگ cc ۲ جمع‌آوری گردید. پس از لخته‌شدن خون و سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور، سرم خون تا زمان سنجش هورمونی در فریزر ۲۰- نگه‌داری شد. سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون و استرادیول با روش الایزا و توسط کیت تشخیص هورمونی (رادیم،ایتالیا) بر اساس دفترچه راهنمای استفاده از آن اندازه‌گیری شد.

**تحلیل آماری**

تحلیل نتایج و رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. با توجه به نرمال بودن داده‌های حاصل از نتایج شاخص‌های بررسی آغاز بلوغ، فاصله آنوژنیتال، آزمون ترجیح ساخارین و سنجش هورمون‌ها، جهت مقایسه میانگین‌های مشاهده شده در هریک از گروه‌ها از آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همین‌طور با

i - Anogenital distance (AGD)
ii - Masculinization
iii - Feminization
iv - Genital papilla

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

توجه به نرمال نبودن داده‌های حاصل از نتایج شاخص‌های بررسی چرخه استروس، فاکتور لوردوز، زمان سپری شده تا انجام اولین مونت و تعداد مونت، مقایسه میانگین‌ها در هریک از گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های غیرپارامتریک کروسکال-والیس و یومان ویتنی تجزیه و تحلیل شدند و سطح معناداری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### نتایج حاصل از بررسی آغاز بلوغ، چرخه استروس و فاصله آنوژنیتال

میانگین روز بازشدن واژن در موش‌های کنترل و شاهد به ترتیب ۳٤/۲۵ و ۳۳/۸۷ روز پس از تولد بود و میانگین آن در گروه‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین به ترتیب ۳۳/۷۵، ۳۳/۸۷ و ۳۱/۱۲ روز پس از تولد بود. بازشدن واژن به‌طور معناداری در گروه ۵۰۰ فورمونونتین، سریع‌تر ($p<۰/۰۱$) از گروه کنترل اتفاق افتاد (جدول۱). میانگین روز جدایی پوست ختنه‌گاه در موش‌های گروه‌های کنترل و شاهد به ترتیب ٤۲/۵۰ و ٤۳/۱۲ روز پس از تولد بود و میانگین آن در گروه-های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین به ترتیب ٤۲/۲۵، ٤٦/۲۵ و ٤٦/٦۲ روز پس از تولد بود. جدایی پوست ختنه‌گاه به‌طور معناداری ($p<۰/۰۱$) در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل با تاخیر مشاهده شد (جدول۱).

**جدول ۱- مقایسه تاثیر تیمارهای نوزادی (۵-۱ روزگی) فورمونونتین بر سن آغاز بلوغ جنسی، چرخه استروس و فاصله آنوژنیتال در گروه‌های مورد مطالعه**

| شاخص‌های ارزیابی | گروه‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | فورمونونتین (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) | | |
| | کنترل | شاهد | ۵ | ۵۰ | ۵۰۰ |
| بازشدن واژن (روز) | ۳٤/۲۵±۰/٦۵ | ۳۳/۸۷±۰/٤۰ | ۳۳/۷۵±۰/۵۹ | ۳۳/۸۷±۰/٤٤ | ۳۱/۱۲±۰/٦٤† |
| جدایی پوست ختنه گاه (روز) | ٤۲/۵۰±۰/۸۲ | ٤۳/۱۲±۰/۵۸ | ٤۲/۲۵±۰/۸٦ | ٤٦/۲۵±۰/٦۵* | ٤٦/٦۲±۰/۷۵† |
| میانگین مدت چرخه استروس (روز) | ٤/٦۲±۰/۱۸ | ٤/۵۰±۰/۱۹ | ٤/۷۵±۰/۱٦ | ۵/۳۷±۰/۳۲ | ۷/۵۰±۰/٤٦‡ |
| موش‌های با چرخه استروس طبیعی (٪) | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ٦۲/۵ | ۱۲/۵ |
| فاصله آنوژنیتال ماده (میلی‌متر) | ۵/۳٦±۰/۱٤ | ۵/٦۱±۰/۱۵ | ۵/٦۹±۰/۱۸ | ۵/۷۰±۰/۱٦ | ۵/٦۷±۰/۱۹ |
| فاصله آنوژنیتال نر (میلی‌متر) | ۱۳/۱۲±۰/۲٦ | ۱۲/۷۵±۰/۲۲ | ۱۲/۹۹±۰/۲۹ | ۱۳/۰۷±۰/۱٦ | ۱۲/۸٦±۰/۲۵ |

*، † و ‡ به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار ($p<۰/۰۵$)، ($p<۰/۰۱$) و ($p<۰/۰۰۱$) با گروه کنترل. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد نشان داده شده‌اند.

به‌طور متوسط طول مدت چرخه استروس در موش‌های گروه‌های کنترل و شاهد به‌ترتیب ٤/٦۲ و ٤/۵۰ روز و میانگین آن در گروه‌های ۵، ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین به‌ترتیب ٤/۷۵، ۵/۳۷ و ۷/۵۰ روز طول کشید. طول مدت چرخه استروس به‌طور معناداری در گروه ۵۰۰ فورمونونتین، طولانی‌تر ($p<۰/۰۱$) از گروه کنترل مشاهده گردید (جدول ۱). همین‌طور در حالی که تمامی موش‌های گروه‌های کنترل، شاهد و ۵ فورمونونتین دارای چرخه استروس طبیعی بودند، ٦۲/۵ درصد موش‌های گروه ۵۰ فورمونونتین و تنها ۱۲/۵ درصد موش‌های گروه ۵۰۰ فورمونونتین دارای چرخه‌های طبیعی استروس بودند (جدول۱).

فاصله آنوژنیتال در موش‌های نر و ماده گروه‌های شاهد و تحت درمان با دوزهای مختلف فورمونونتین تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان ندادند (جدول۱).

### نتایج حاصل از بررسی رفتار تولیدمثلی

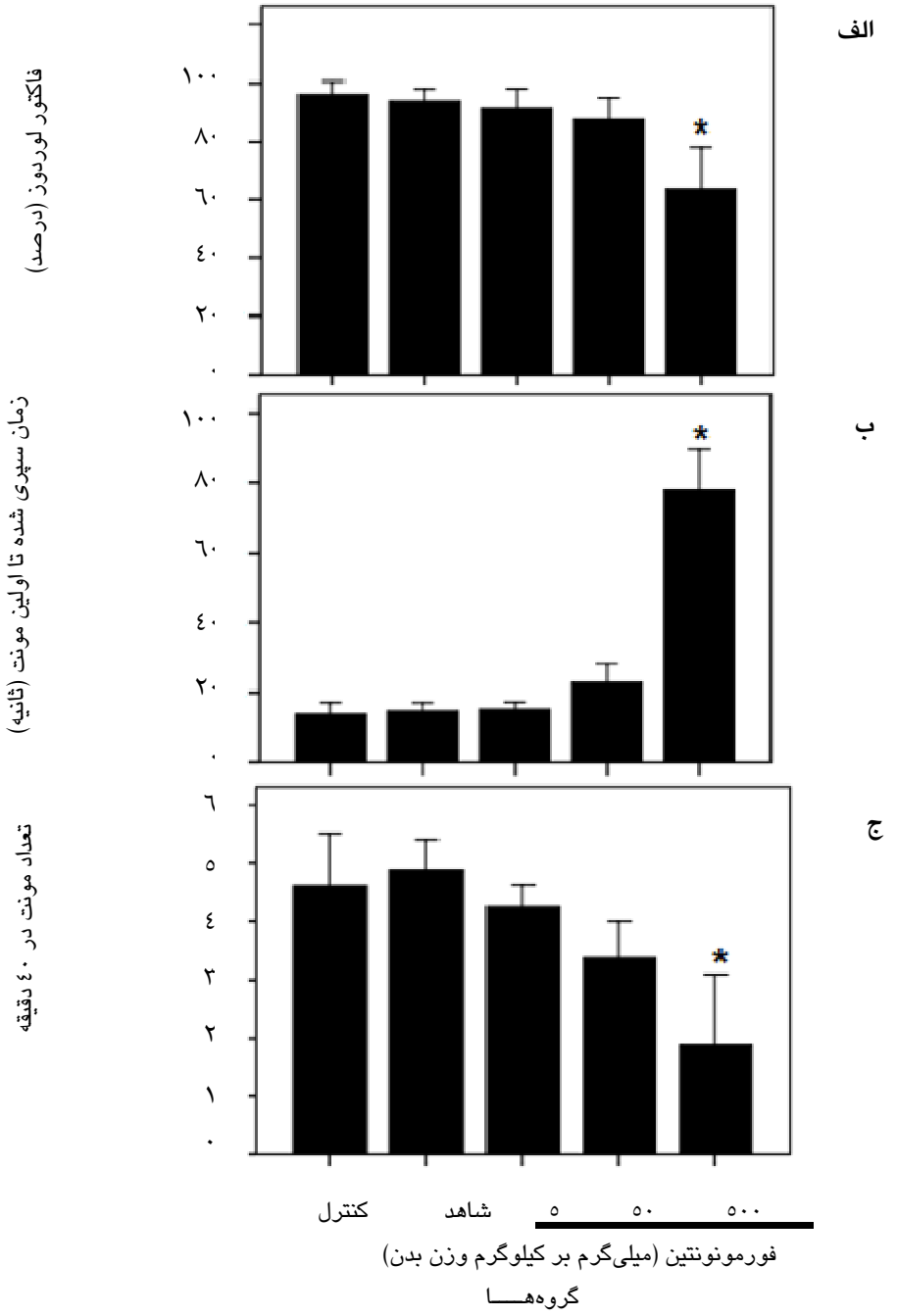
در بررسی رفتار جنسی موش‌های ماده، با توجه به نمودار شماره۱-الف، درصد فاکتور لوردوز در گروه ۵۰۰ فورمونونتین به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). در بررسی رفتار جنسی موش‌های نر، افزایش معناداری در مدت زمان تا انجام اولین مونت در گروه ۵۰۰ فورمونونتین و در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار شماره۱-ب). در همین رابطه، کاهش معناداری در تعداد مونت در گروه ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار شماره۱-ج).

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019




**نمودار ۱- تاثیر تجویز فورمونونتین در دوره نوزادی (۵-۱ روزگی) بر فاکتور لوردوز (الف)، زمان سپری شده تا انجام اولین مونت(ب) و تعداد مونت (ج) در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. ***

نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار ($p<۰/۰۰۱$) با گروه کنترل. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد نشان داده شده‌اند.

**نتایج حاصل از بررسی آزمون ترجیح ساخارین**

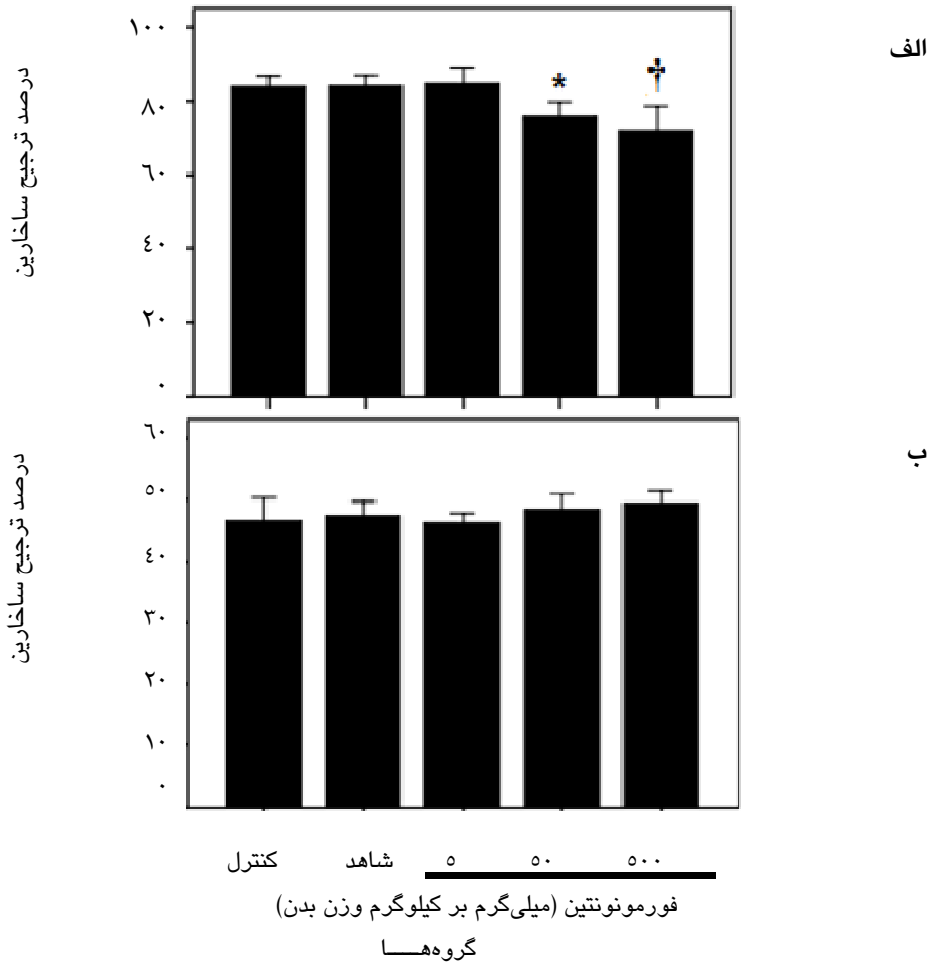
در موش‌های ماده، کاهش معناداری در درصد ترجیح ساخارین در گروه‌های ۵۰ ($p<۰/۰۵$) و ۵۰۰ فورمونونتین ($p<۰/۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد، اما در موش‌های نر، علی‌رغم افزایش جزئی در گروه‌های ۵۰ و ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد (نمودار شماره۲).

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019




**نمودار ۲- تاثیر تجویز فورمونونتین در دوره نوزادی (۵-۱ روزگی) بر درصد ترجیح مصرف محلول ساخارین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده (الف) و نر (ب).**

* و † به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار $p<0/05$ و $p<0/01$ با گروه کنترل. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد معیار نشان داده شده‌اند.

**نتایج حاصل از بررسی هورمونی**

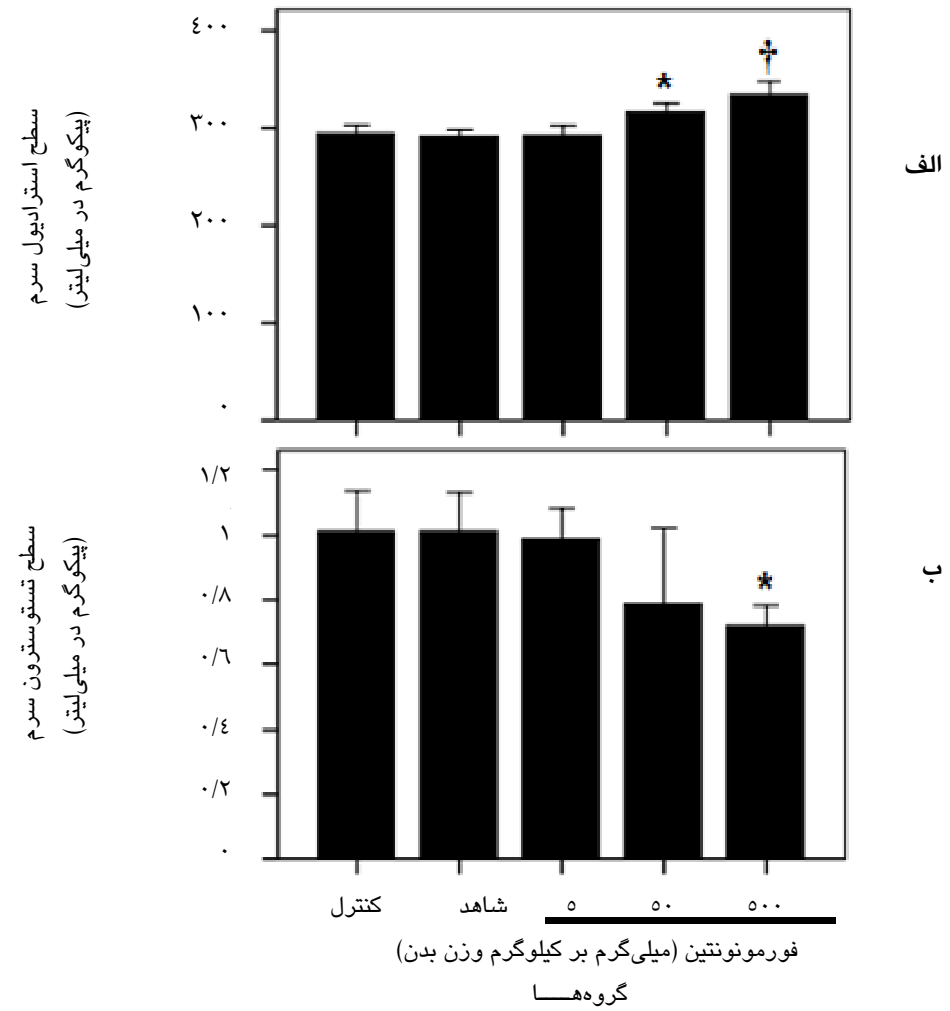
در موش‌های ماده، سطح هورمون استرادیول در گروه‌های ۵۰ ($p<0/01$) و ۵۰۰ فورمونونتین ($p<0/001$) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (نمودار شماره۳-الف). در موش‌های نر، سطح هورمون تستوسترون در گروه ۵۰۰ فورمونونتین در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری ($p<0/01$) کاهش یافت، اما در گروه ۵۰ فورمونونتین علی‌رغم کاهش چشم‌گیر این هورمون در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معناداری مشاهده نشد (نمودار شماره۳-ب).

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019




**نمودار ۳- تاثیر تجویز فورمونونتین در دوره نوزادی (۵-۱ روزگی) بر (الف) سطح هورمون استرادیول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده و بر (ب) سطح هورمون تستوسترون در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر.**

* و † به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار $p<0/01$ و $p<0/001$ با گروه کنترل. تعداد موش‌ها در هر گروه ۸ سر بود و داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد نشان داده شده‌اند.

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار نوزادی فورمونونتین حاصل از شبدر قرمز به‌ویژه با دوز ۵۰۰ میلی-گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در موش‌های ماده منجر به بلوغ زودرس، اختلال در چرخه استروس، کاهش رفتار جنسی، کاهش درصد ترجیح ساخارین و افزایش سطح هورمون استرادیول می‌گردد. این تیمار در موش‌های نر منجر به تاخیر در بلوغ جنسی، کاهش رفتار جنسی و کاهش سطح هورمون تستوسترون می‌شود.

تجویز نوزادی فورمونونتین در موش‌های ماده، موجب بازشدن زودتر از موعد واژن و در نتیجه بلوغ زودرس و در موش‌های نر، موجب تاخیر در جداشدن پوست ختنه‌گاه و در نتیجه بلوغ دیررس شد. تعدادی از مطالعات حکایت از آن دارند که افزایش وزن و چاقی به علت افزایش توده چربی بدن می‌تواند موجب بلوغ زودرس و کاهش وزن و لاغری موجب بلوغ دیررس گردد.[۲۰،۲۱] در این مطالعه، در بررسی

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

وزن در سن بلوغ و دوران پس از بلوغ، تغییرات معناداری در وزن بدن بین گروه‌های تیماری با گروه کنترل مشاهده نگردید (به علت عدم بروز تغییرات وزن در مقایسه بین کلیه گروه‌ها نتایج آن نشان داده نشد). می‌توان گفت که ارتباطی بین وزن بدن و تغییر در سن آغاز بلوغ در مطالعه حاضر استنباط نمی‌شود. موش‌های گروه کنترل و شاهد چرخه‌های استروس طبیعی (٤ تا ٥ روزه) را نشان دادند، در صورتی‌که در موش‌های تحت درمان با فورمونونتین (به‌ویژه با دوز بالاتر)، چرخه‌های استروس مختل شده (طولانی شده) و در مجموع تعداد چرخه‌های کمتری را نشان دادند. مشاهدات این مطالعه هم‌راستا با مشاهدات فیتواستروژن‌های دیگر ازجمله کامسترول[۸]، جنیستین[۲۲] و زیرالنون[۲۳] (نوعی استروژن قارچی) می‌باشد.

تنظیم آغاز بلوغ و به دنبال آن تنظیم چرخه جنسی تحت کنترل سیستم نوروآندوکرین و فعال‌سازی هورمونی محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد می‌باشد که تا پیش از سن بلوغ خاموش است. مهمترین نوروهورمون دخیل در تنظیم آغاز بلوغ و چرخه استروس، هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) در هیپوتالاموس می‌باشد که موجب تحریک ترشح هورمون‌های LH و FSH از هیپوفیز پیشین می‌شود. LH با اثر بر گنادهای نر و ماده باعث تولید و ترشح هورمون‌های جنسی استروژن از تخمدان و تستوسترون از بیضه‌ها می‌شود. افزایش ترشح هورمون‌های جنسی در سن بلوغ نیز موجب بروز تغییرات وابسته به جنس از جمله رشد پستان، ظهور مو در اندام‌های جنسی، افزایش قد، رشد استخوانی و غیره می‌گردد. بنابراین عوامل مداخله‌گر اندوکرین که قادر به تغییر ترشح GnRH یا سایر سطوح هورمونی محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد می‌باشند، قادر به تغییر در سن آغاز بلوغ نیز هستند.[۲۰،۲٤]

فرآیند بازشدن واژن یک پدیده آپوپتوزی و شاخص مناسب برای بررسی سن آغاز بلوغ در جوندگان است. این پدیده در حدود سن بلوغ به دنبال فعال شدن کلیه سطوح محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد و در نتیجه افزایش ترشح استرادیول اتفاق می‌افتد.[۲۵] در این مطالعه، تسریع در بازشدن واژن مشاهده گردید که به نظر می‌رسد به علت تسریع در فعال‌سازی محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد و در نتیجه ترشح زودهنگام هورمون استرادیول باشد. افزایش سطح هورمون استرادیول در موش‌های این مطالعه می‌تواند مؤید این فرآیند باشد. مطالعات جوندگان آزمایشگاهی تاییدکننده این مطلب است که مواجهه استروژن یا ترکیبات استروژنیک با تاثیر بر سطوح هورمون‌های محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد موجب تسریع در رشد و تکوین اندام‌های جنسی ماده شده و بلوغ را تسریع می‌بخشد.[۸،۲۲،۲۳]

فرآیند جدایی پوست ختنه‌گاه یک نشانه عمده آغاز بلوغ در جوندگان نر است که به دنبال فرآیند شاخی‌شدن بافت پوششی سنگفرشی مطبق پوست ناحیه ختنه‌گاه پنیس اتفاق می‌افتد. این فرآیند یک شرط ضروری برای کسب انزال کامل و وابسته به آندروژن می‌باشد.[۲٦] در این مطالعه، تاخیر در روز جدایی پوست ختنه‌گاه مشاهده گردید که به نظر می‌رسد به علت تاخیر در فعال‌سازی محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد و در نتیجه تاخیر در ترشح هورمون تستوسترون باشد. کاهش سطح هورمون تستوسترون در موش‌های این مطالعه می‌تواند موید این روند باشد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تیمار موش‌ها در دوره حاملگی و نوزادی با دی-اتیل‌استیل‌بسترول[i] (یک ترکیب استروژنیک غیراستروئیدی) و عصاره الکلی رازک (به عنوان یک گیاه غنی از فیتواستروژن) منجر به تاخیر در آغاز بلوغ جنسی گردیده است[۱۷،۲۷،۲۸] که با مطالعه کنونی هم‌خوانی دارد.

در هیپوتالاموس جوندگان، هسته‌هایی با نورون‌های حساس به استروژن از جمله هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی و هسته قوسی[ii] وجود دارند که در کنترل عملکرد محور تولیدمثل از جمله تنظیم سن آغاز بلوغ و تنظیم چرخه استروس نقش دارند. نورون‌های این هسته‌ها، حاوی گیرنده-های استروژن بوده و نسبت به تغییرات سطوح استروژن خون به‌ویژه در دوره نوزادی حساسیت زیادی دارند. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که آسیب به این هسته‌ها و نورون‌های موجود در آن‌ها زمان آغاز بلوغ و چرخه استروس جوندگان را مختل می‌کند.[۸ و ۲۲-۲۰] بررسی‌ها نشان داده که این هسته‌ها به صورت دوشکلی جنسی می‌باشند. بروز این دوشکلی جنسی به سطوح پایین استروژن در دوره‌های بحرانی هورمونی از جمله نوزادی در جوندگان و اواخر جنینی در انسان بستگی دارد زیرا تجویز استروژن یا فیتواستروژن‌ها در موش‌های نوزاد باعث اختلال در ترشح هورمون‌های جنسی می‌گردد[۷،۲۳،۲۹] که با توجه به افزایش سطح استرادیول و کاهش سطح تستوسترون سرم در مطالعه حاضر با آن هم‌خوانی دارد.

---

i -Diethylstilbestrol
ii - *Arcu*ate nucleus

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

به عنوان مثال هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی در جنس ماده دارای اندازه بزرگ‌تر و تعداد نورون‌های بیشتری نسبت به جنس نر می‌باشد. نورون‌های این هسته در کنترل تنظیم سن بلوغ و تنظیم چرخه استروس نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند. دوشکلی جنسی هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی به واسطه حضور تستوسترون نوزادی و آروماتیزاسیون آن در مغز به استرادیول می‌باشد که منجر به ماده‌زدایی این هسته می‌گردد. وجود همین دوشکلی جنسی باعث به‌وجود آمدن مکانیسم بازخورد مثبت استرادیول و درنتیجه تولید موج GnRH/LH در جوندگان ماده و فقدان آن در جوندگان نر شده است. تجویز استرادیول یا ترکیبات شبه استروژن به نوزاد جوندگان ماده منجر به کاهش اندازه هسته و کاهش تعداد نورون‌های هسته پیش‌بطنی جلویی شکمی (نرینه سازی آن) و اخته‌سازی نوزاد نر، موجب مادینه‌سازی مغز آنها می‌گردد.[۳۰] ممکن است که در دوره نوزادی، فورمونونتین به عنوان یک ترکیب استروژنیک با اتصال به گیرنده‌های استروژن در هیپوتالاموس از تشکیل و تکوین مدارهای عصبی حساس به استروژن کنترل کننده بلوغ و چرخه استروس جلوگیری کند.

فاصله آنوژنیتال در هر دو جنس نر و ماده در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری نداشتند. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تجویز نوزادی فورمونونتین تاثیری بر فاصله آنوژنیتال نداشته است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تجویز فتالات‌ها که ترکیبات صنعتی مداخله-گر آندروژنیک هستند و تجویز ترکیباتی مثل بیس فنول‌آ و برخی حشره‌کش‌ها که دارای هر دو نوع فعالیت آندروژنیک و استروژنیک می‌باشند باعث کاهش فاصله آنوژنیتال می-شوند. همین‌طور این مطالعات نشان داده‌اند که این بیومارکر دوشکلی جنسی، بیشتر تحت تاثیر آندروژن‌ها در دوره جنینی می‌باشد تا دوره نوزادی.[۳۱-۳۳]

نتایج این مطالعه حاکی از کاهش فاکتور لوردوز در موش‌های ماده و هم‌چنین کاهش زمان سپری شده تا اولین مونت و تعداد مونت توسط موش‌های نر به‌ویژه با دوز ۵۰۰ فورمونونتین می‌باشد. هسته هیپوتالاموسی شکمی میانی[i]، مرکز کنترل رفتار جنسی جوندگان ماده است که یک هسته دوشکلی جنسی می‌باشد. آسیب به این هسته منجر به کاهش یا ازبین رفتن این رفتار در جوندگان می‌گردد و تجویز هورمون استرادیول به‌طور مستقیم به این هسته باعث بروز آن می‌گردد. تکمیل و تشکیل مدارهای نورونی در هسته هیپوتالاموسی شکمی میانی در طی دوران تکوین وابسته به غلظت پایین استروژن می‌باشد. نورون‌های این هسته به میزان زیادی گیرنده‌های استروژن را بیان می‌کنند. شواهد نشان می‌دهند که افزایش استروژن در طی دوره تکوین از تشکیل صحیح مدارهای نورونی این ناحیه جلوگیری کرده و منجر به کاهش یا سرکوب رفتار جنسی ماده می‌گردد.[۲۹] کاهش فاکتور لوردوز و سرکوب رفتار جنسی در مطالعه حاضر در تیمارهای پیشین با جنیستین، کامسترول و رازیانه نیز مشاهده شده است.[۸،۲۲،۱۶] همین‌طور هسته پره اپتیک میانی[ii] یک هسته دوشکلی جنسی می‌باشد که در موش‌های نر تقریبا سه برابر بزرگتر از موش ماده بوده و مرکز کنترل رفتارهای جنسی نر می‌باشد. هرگونه آسیب به این ناحیه و کاهش نورون‌های آن منجر به سرکوب و تحریک آن و در نتیجه باعث برانگیختن رفتارهای جنسی نر می‌گردد. دلیل دوشکلی بودن این هسته حضور تستوسترون در دوران تکوینی اواخر جنینی و چند روز اول پس از تولد در جوندگان نر می‌باشد. در جوندگان ماده، فقدان تستوسترون در این دوران منجر به آپوپتوز نورون‌های این ناحیه هیپوتالاموسی و کاهش اندازه آن می‌گردد.[۲۹] بنابراین به نظر می‌رسد در دوره‌های حساس هورمونی، ترکیب استروژنیک فورمونونتین بر روند نورون‌زایی هسته‌های کنترل کننده رفتار جنسی در هر دو جنس نر و ماده اثرات سوئی را اعمال می‌کند که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حدود ۸٤ درصد مایع مصرفی موش‌های ماده گروه کنترل از محلول ساخارین و حدود ۱٦ درصد آب بود. اما فقط ٤٦/٥ درصد مایع مصرفی در موش‌های نر گروه کنترل از محلول ساخارین بود. این نتایج در توافق با برخی مطالعات دیگر می‌باشد که در آن‌ها میزان مصرف ساخارین در موش‌های ماده از نر بیشتر بوده و نشان‌دهنده دوشکلی جنسیتی این فعالیت است. در مطالعه-ای نشان داده شده است که تجویز اتینیل استرادیول در دوران تکوین قادر به ماده‌زدایی این فعالیت در موش‌های ماده می‌باشد که در هماهنگی با این مطالعه و تجویز با فورمونونتین با دوزهای بالاتر است.[۳٤] به نظر می‌رسد این فعالیت می‌تواند ناشی از اثرات مستقیم فورمونونتین بر

i - Ventromedial hypothalamic nucleus (VMN)

ii – Medial preoptic area (mPOA)

www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

نواحی مغزی باشد که این رفتار را کنترل می‌کنند یا می‌تواند ناشی از اثرات فورمونونتین بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، چرخه استروس یا سطح هورمون استرادیول باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد. هم‌چنین، در مطالعه دیگری نشان داده شده است که تجویز مخلوطی از بی فنیل-های پلی کلرینات در دوران تکوین موش‌های نر، علاوه بر کاهش آنزیم آروماتاز هیپوتالاموس (تبدیل‌کننده تستوسترون به استرادیول) و کاهش سطح هورمون تستوسترون منجر به مادینه شدن و افزایش مصرف شیرین-کننده شده است. ولی در مطالعه حاضر در موش‌های نر افزایش جزئی در مصرف شیرین‌کننده مشاهده گردید که معنادار نبود. به نظر می‌رسد که اثرات فورمونونتین در این رفتار بیشتر در موش‌های ماده و نه نر موثر باشد.[۳۵]

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم مطالعات ایمونوهیستوشیمی، شمارش نورونی و بیان ژن-های مرتبط در هسته‌های دوشکلی جنسی مغز ازجمله هسته‌ی پیش‌بطنی جلویی شکمی، هسته‌ی قوسی و هسته‌ی پره‌اپتیک میانی اشاره کرد که پیگیری آن‌ها در مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که تجویز نوزادی فورمونونتین با تاثیر بر شاخص‌های دوشکلی جنسی ازجمله زمان‌بندی سن آغاز بلوغ، چرخه استروس، رفتار جنسی، درصد ترجیح ساخارین و سطوح هورمونی ممکن است باعث مادینه‌زدایی[i] و نرینه‌زدایی[ii] هسته‌ها و مدارهای نورونی حساس به استروژن در مغز گردد که مطالعات آن در آینده پیشنهاد می‌شود. همین‌طور به نظر می-رسد اثرات مشاهده شده در جنس ماده شدیدتر از جنس نر باشد.

**سپاسگزاری**: این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه پیام نور (گرنت اساتید: ابلاغیه شماره ۷/۷/٤۹۱۰۳/د) انجام شده است که بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.
تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

i- Defeminization
ii- Demasculinization

## References

1. Mostrom M, Evans TJ. Phytoestrogens. in: R.C. Gupta (Ed.) Reproductive and developmental toxicology. Academic Press/Elsevier, London; 2011: 707–22.
2. Sirotkin AV, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. Eur J Pharmacol 2014; 741: 230-6.
3. Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. Reproduction 2012; 143: 247-60.
4. Patisaul HB. Endocrine disruption by dietary phyto-oestrogens: impact on dimorphic sexual systems and behaviours. Proc Nutr Soc 2017; 76: 130-44.
5. Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, Adlercreutz H, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. Neurotoxicol Teratol 2002; 24: 5-16.
6. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. Front Neuroendocrinol 2010; 31: 400-19.
7. Henry LA, Witt DM. Effects of neonatal resveratrol exposure on adult male and female reproductive physiology and behavior. Dev Neurosci 2006; 28: 186-95.
8. 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: 449-54.
9. 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.
10. 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: 121-30.[Farsi]
11. 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: 314-9.
12. 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: 645-61.
13. 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.
14. Zhou Y, Zhu W, Guo Z, Zhao Y, Song Z, Xiao J. Effects of maternal nuclear genome on the timing of puberty in mice offspring. J Endocrinol 2007; 193: 405-12.
15. Parandin R, Daroogari Sh. The Effect of Alcoholic Extract of Humulus Lupulus During Pregnancy and Lactation on Sexual Maturation and Some Reproductive Indices in Male Rats. JBUMS 2018; 20: 43-9. [Farsi]
16. Parandin R, Yousofvand N. In Utero and Lactational Effects of Aqueous Foeniculum Vulgare (Fennel) Seed Extract on Puberty Timing, Estrus Cycle and Sexual Behavior in Mice. J Arak Uni Med Sci 2018; 20: 1-12. [Farsi]
17. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. Environ Sci Pullut Res 2014; 21: 2457-64.
18. Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on repro-

www.SID.ir

Archive of SID



ductive development in male and female rats. Int J Androl 2012; 35: 330-39.
19. Sclafani A, Bahrani M, Zukerman S, Ackroff K. Stevia and saccharin preferences in rats and mice. Chem Senses 2010; 35: 433-43.
20. Ebling FJ. The neuroendocrine timing of puberty. Reproduction 2005; 129: 675-83.
21. Foster PM, McIntyre BS. Endocrine active agents: implications of adverse and nonadverse changes. Toxicol Pathol 2002; 30: 59-65.
22. 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: 140-5.
23. 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: 1293-303.
24. Ozen S, Darcan S. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2011; 3: 1-6.
25. Ksheerasagar RL, Kaliwal BB. Effects of carbosulfan administration schedules on estrous cycle and follicular dynamics in albino mice. Ind Health 2008; 46: 210-6.
26. Mathias FT, Romano RM, Sleiman HK, de Oliveira CA, Romano MA. Herbicide metolachlor causes changes in reproductive endocrinology of male wistar rats. ISRN Toxicol 2012; 2012: 130846.
27. Yoshimura S, Yamaguchi H, Konno K, Ohsawa N, Noguchi S, Chisaka A. Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. J Toxicol Pathol 2005; 18: 141-57.
28. Zawatski W, Lee MM. Male pubertal development: are endocrine-disrupting compounds shifting the norms. J Endocrinol 2013; 218: 1-12.
29. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. Physiol Rev 2008; 88: 91-124.
30. d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The role of kisspeptin signaling in reproduction. Physiology (Bethesda) 2010; 25: 207-17.
31. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. Environ Sci Pullut Res 2014; 21: 2457-64.
32. Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. Curr Urol Rep 2008; 9: 137–42.
33. Honmaa S, Suzukib A, Buchananb DL, Katsub Y, Watanabeb H, Iguchi T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. Reprod Toxicol 2002; 16: 117–22.
34. 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: 133-48.
35. Kaya H, Hany J, Fastabend A, Roth-Härer A, Winneke G, Lilienthal H. Effects of maternal exposure to a reconstituted mixture of polychlorinated biphenyls on sex-dependent behaviors and steroid hormone concentrations in rats: dose-response relationship. Toxicol Appl Pharmacol 2002; 178: 71-81.

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

www.SID.ir

Archive of SID


Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 8:58 +0430 on Wednesday June 12th 2019

*Original Article*

# The Effects of Neonatal Exposure of Formononetin Drived from Red Clover on Some Parameters of Sexually Dimorphic of Mice

Parandin R, Mohammadi L

Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, I.R. Iran

e-mail: rparandin@gmail.com

**Received**: 30/09/2018 **Accepted**: 12/03/2019

**Abstract**

**Introduction: Formononetin is a phytostrogen found in plants such as red clover (Trifolium pratense), which has a chemical structure similar to the estradiol hormone. The aim of this study was to investigate the effects of formononetin derived from red clover on sexual dimorphic indices in mice during neonatal life. Materials and Methods: In this experimental study, male and female neonate mice were randomly divided into the control, vehicle and 3 groups (n=8) received formonetonin subcutaneously at doses of 5, 50 and 500 mg/kg body weight on days 1-5 after birth. After examining the puberty timing, parameters of estrus cycle, anogenital distance, sexual behavior, preferred saccharin and sex hormones were also investigated. The data were analyzed by SPSS statistical software and OneWay ANOVA test. Significance was shown at p values<0.05. Results: Puberty in females was significantly advanced by 500 mg/kg ($p<0.01$) and in male mice was delayed by 50 ($p<0.05$) and 500 mg/kg formonotonin ($p<0.01$). Mean duration of estrus cycle increased in 500 mg/kg formonotonin ($p<0.05$). Lordosis and mount numbers in 500 ($p<0.001$) decreased and the mean latency to the first mounts increased by 500 formonotonin ($p<0.001$). Percentage of saccharin preference increased by 50 ($p<0.05$) and 500 mg/kg formonotonin ($p<0.01$) in female mice. In addition, estradiol level in 50 ($p<0.01$) and 500 mg/kg ($p<0.001$) doces decreased and testosterone level in 500 formonotonin mg/kg ($p<0.01$) decreased, compared with controls. Conclusion: The results of this study show that the administration of formonotonin during the neonatal period of mice has the potential to cause development of sexual dimorphism parameters.**

**Keywords**: Formonotonin, Sexually dimorphic, Estrogen, Mice

www.SID.ir