زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره اول، پاییز ۹۹، صفحات ۳۹- ۲۹

مقاله پژوهشی

اثر عصاره برگ شبدر قرمز (*Trifolium pretense L*) بر بیان ژن‌های موثر در فولیکوژنز و تکثیر سلول‌های گرانولوزای تخمدان موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI

فرزانه رنگ‌آمیز[۱]، جواد بهارآرا [۲*]، خدیجه شاهرخ آبادی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: baharara87@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱٤

چکیده

ناباروری، یکی از مشکلات عمده پزشکی در دنیای امروز است. امروزه برخی مطالعات به بیان اثرات ترکیبات فیتواستروژنی در درمان ناباروری پرداخته‌اند. شبدر قرمز یکی از گیاهانی است که حاوی ترکیبات فیتواستروژنی است. در پژوهش حاضر اثر عصاره برگ شبدر قرمز بر بیان ژن‌های موثر در فولیکوژنز و تکثیر سلول‌های گرانولوزا در موش ماده کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI بررسی شده است. در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی تعداد ۳۰ سر موش ماده نابالغ ۲۰-۱۸ روزه نژاد NMRI استفاده شد. جهت انجام تجربیات سلول‌های گرانولوزای فولیکولی جداسازی شدند، سلول‌های حاصل در محیط *in vitro* به ٦ گروه به صورت تصادفی تقسیم بندی شدند. گروه شاهد (بدون تیمار) و گروه‌های تجربی با غلظت‌های (۱۰، ۱۵، ۲۰، ٤۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره برگ شبدر قرمز تیمار و زیست پذیری سلول‌ها از طریق رنگ‌آمیزی تریپان بلو و رنگ سنجیMTT بررسی شد. همچنین تغییرات بیان ژن‌های BMP15 وFOXO1 به روش Real Time PCR ارزیابی گردید. نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلو و آزمون MTT نشان داد با افزایش غلظت و زمان تیمار با عصاره برگ شبدر میزان بقاء سلولی کاهش یافته است. همچنین بررسی سطح بیان ژن‌های BMP15 و FOXO1 در گروه تیماری ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با عصاره برگ شبدر قرمز در مقایسه با گروه شاهد به طور معناداری افزایش نشان داد ($p < ۰/۰۵$). با توجه به اثر عصاره برگ شبدر قرمز بر تکثیر سلول‌های گرانولوزا و بیان ژن‌های موثر در فولیکوژنز می‌توان این گیاه به عنوان کاندید مناسبی برای مطالعات بالینی درمان ناباروری مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ناباروری، شبدر قرمز، فولیکوژنز، سلول گرانولوزا، ژن BMP15، ژن FOXO1.

مقدمه

مطالعات رشد جمعیت و درمان ناباروری، به ویژه در کشورهای در حال توسعه از اهمیت فراوانی برخوردار است (۱۰). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد در دو دهه اخیر ناباروری در کشورهای در حال توسعه و به ویژه در مناطق آفریقا و جنوب آسیا رو به افزایش است و هم اکنون ۱۵-۱۰ درصد زوجین از این مشکل رنج می‌برند، فاکتورهای مختلف از جمله عفونتها، ژنتیک، محیط، تغذیه و اجتماع بر ناباروری موثر است (۱۳). امروزه با توجه به آثار سوء و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، در دهه‌های اخیر استفاده از طب سنتی به

خصوص گیاه درمانی مد نظر قرار گرفته است در سال‌های اخیر توجه زیادی به مطالعه اثرات گیاهان مختلف بر روی باروری پستانداران شده است و از نتایج حاصل از این مطالعات، اطلاعات ارزشمندی به دست آمده است (۱۹).

شبدر قرمز با نام علمی *Trifolium pretense L* به جنس *Trifolium* و خانواده Fabaceae تعلق دارد و در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری هر دو نیمکره شمالی و جنوبی رشد می‌کند (۲۷).

این گیاه در ایران در استان‌های آذربایجان، گیلان، مازندران، کردستان، باختران، تهران، زنجان، کرمان، یزد، فارس، اصفهان، خراسان و همدان انتشار دارد (۲۰). مطالعات نشان داده است که عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز حاوی مقادیر بالایی از چهار نوع ایزوفلاون استروژنیک شامل Genistein، Dadzein، Biochanin A، Formentin می‌باشد، از جمله دیگر ترکیبات گیاه ساپونین‌ها، فیتواسترول‌ها، الیگوساکاریدها و اسید فیتیک می‌باشد (۲۱).

همچنین مواد موجود در شبدر دارای خواص دارویی می‌باشد مثلا فورمنتین موجود در شبدر قرمز از ارزش دارویی بالایی برخوردار است و می‌تواند از رشد سلول‌های سرطان سینه در زنان جلوگیری کند، اما مصرف آن سبب مشکلات جنسی در مردان می‌شود (۱٤).

اغلب مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات درمانی شبدر قرمز به خواص فیتواستروژنیک ایزوفلاون‌های آن تاکید دارند، ایزوفلاون‌های گیاه از طریق فعل و انفعال با گیرنده‌های استروژن علائم یائسگی را در زنان بهبود می‌دهند. ترکیبات استروژنیک با اتصال به رسپتورهای استروژنیک بتا و با تاثیر به سیستم‌های دوپامینرژیک، سروتونرژیک و کولینرژیک عملکرد شناختی و خلق و خو نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۱). علاوه بر اثرات استروژنیک، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدرگ‌زایی، ضدالتهابی و ضدسرطانی گیاه شبدر قرمز در محیط برون سلولی، سلولی و مدل‌های جانوری نشان داده شده است (۱۵).

برخی مطالعات ایزوفلاون‌ها را جایگزین مناسبی برای هورمون درمانی دوران یائسگی ذکر می‌نمایند. همچنین توانایی اتصال ایزوفلاون شبدر قرمز به گیرنده‌های استروژنی بتا موجب تاثیر مثبت بر دانسیته استخوان، مخاط واژن و مغز بدون افزایش خطر سرطان رحم و پستان می‌شود. این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان عامل خلط‌آور، ضد عفونی کننده، ضد درد، ضد سرفه، تب بر، بهبود دهنده ذات‌الریه و منتژیت، درمان کننده مشکلات پوستی، بیماری‌های ریه و برخی از اختلالات سیستم عصبی و باروری استفاده می‌شود (٦).

Ulkay و همکارانش طی پژوهشی دریافتند رژیم غذایی حاوی شبدر قرمز در کوتاه مدت بر روی اسپرماتوژنز اثر مثبت و در طولانی مدت اثر منفی دارد (۲۹).

ربیعی و همکاران اثرات ضد افسردگی شبدر قرمز را در موش بررسی کردند (۲٦).

Pakalapati و همکاران اثرات ضد التهابی شبدر قرمز را نشان دادند (۲۲).

با توجه به موارد فوق و از آنجایی که از دیدگاه علمی، سودمندی داروهای گیاهی می‌بایست در کارآزمایی‌های آزمایشگاهی و بالینی مورد اثبات قرار گیرند و نیز استفاده وسیع از گیاه شبدر قرمز در درمان سنتی برخی از بیماری‌ها و با توجه به اینکه تا کنون در زمینه اثرات عصاره برگ این گیاه بر ناباروری مطالعه‌ای صورت نگرفته است،

در پژوهش حاضر اثر عصاره برگ شبدر قرمز بر بیان ژن‌های موثر در فولیکوژنز و تکثیر سلول‌های گرانولوزا در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) بر روی

موش ماده کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

روش تحقیق: این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی است که در سال تحصیلی ۹۸-۱۳۹۷، در مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد.

جمع آوری گیاه و عصاره‌گیری: گیاه شبدر قرمز از ارتفاعات اطراف شهرستان بجنورد (استان خراسان شمالی)، در اواخر بهار سال ۱۳۹۷جمع آوری شد. سپس توسط هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد با کد ٤٥٩٦٣ شناسایی و تایید گردید. برای عصاره‌گیری، برگ‌های گیاه خشک و پودر شد. ۱۵ گرم از پودر برگ گیاه در ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول حل گردید، پس از ۷۲ ساعت به وسیله کاغذ صافی فیلتر شد سپس جهت تغلیظ و عصاره‌گیری در دستگاه روتاری (Heidolph, Germany) قرار گرفت و در دمای ٤٠c° در آون خشک شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز، پودر حاصل از عصاره‌گیری، توزین و در محیط کشت α-MEM حل گردید (۲۳).

حیوانات آزمایشگاهی: حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه، تعداد ۳۰ سر موش ماده نابالغ ۲۰-۱۸ روزه نژاد NMRI بودند که از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد تهیه شد و در شرایط استاندارد ۱۲ساعت روشنایی/ تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا و دمای ۲۲±۲°c نگهداری شدند. همچنین در طی مدت انجام آزمایش‌ها بر روی حیوانات، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی رعایت گردید.

کشت سلول: موش‌های ماده نابالغ ۲۰-۱۸ روزه نژاد NMRI پس از بیهوشی با کلروفورم، با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم، تخمدان‌ها از بدن جدا و در محیط کشت α-MEM حاوی ۵ درصد FBS قرار داده شدند (۱). جداسازی بافت‌های زاید و فولیکول‌ها، با استفاده از استریومیکروسکوپ و به روش مکانیکی انجام شد. سپس فولیکول‌ها به تعداد برابر در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه حاوی محیط کشت α-MEM با تمامی مکمل‌ها (FSH, FBS, ITS, آنتی بیوتیک) داخل انکوباتور ۳۷°c و ۵ درصد co_2 به مدت ٦ روز کشت داده شدند و یک روز در میان نیمی از محیط کشت با محیط کشت تازه جایگزین شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر و رشد سلول‌های گرانولوزا توسط غلظت‌های مختلفی از عصاره برگ شبدر قرمز (۱۰، ۱۵، ۲۰، ٤٠، ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار انجام شد (١٦).

بررسی اثر سمیت سلولی: برای بررسی سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز بر سلول‌های گرانولوزا و تعیین دوز میانه مهاری IC50 (Inhibitory Concentration) از روش رنگ سنجی MTT (Sigma, USA) استفاده شد. تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول در چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه کشت داده شدند. ٢٤ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز (۱۰، ۱۵، ۲۰، ٤٠،۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ٢٤ و ٤٨ ساعت تیمار و مقدار ۱۰ میکرولیترMTT به هر چاهک اضافه و سلول‌ها به مدت ٤ ساعت تحت تیمار با MTT انکوبه شدند. سپس جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک ۸۰ میکرولیترDMSO اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch, USA) اندازه گیری شد (۲).

رنگ آمیزی تریپان بلو: جهت سنجش توانایی حیات سلول‌های تیمار شده با عصاره برگ شبدر قرمز از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. در این روش، سلول‌های مرده به علت نفوذ پذیری به تریپان

بلو به رنگ آبی مشاهده می‌شوند و سلول‌های بی‌رنگ به عنوان سلول زنده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر زیست‌پذیری سلول‌ها در هر غلظت محاسبه شد (۷).

$$\text{Viability} = \frac{\text{Number of viable ceIIs} \times 2 \times 10^4}{4}$$

بررسی تغییرات بیان ژن‌های BMP15 وFOXO1: بعد از گذشت ۲٤ ساعت از تیمار جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های BMP15 و FOXO1 ابتدا استخراج RNA کل از گروه کنترل و تیمار با استفاده از کیت RNA شرکت (Parstous, Iran) و مطابق با دستور العمل آن انجام شد. جهت اطمینان از کمیت RNAهای استخراج شده، جذب آن در طول موج ۲۸۰-۲٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ) اندازه‌گیری شد. سپس سنتز cDNA از RNA استخراج شده طبق دستور پروتکل Easy cDNA Synthesis kit شرکت (Parstous,Iran) انجام گرفت. در مرحله بعد پرایمرها بصورت آنلاین طراحی و از نظر مقدار TM و CG پرایمر دایمر و کیفیت در سایت Blast، NCBI گردید بدین صورت که آغازگرهای اختصاصی برای ژن BMP15 وFOXO1 به عنوان ژن هدف و GAPDH به عنوان کنترل داخلی طراحی شدند (جدول ۱). در نهایت برای دست‌یابی به پاسخ بیان ژن‌های BMP15 وFOXO1 تحت تاثیر عصاره مورد نظر، واکنش Real Time PCR انجام گردید. برای انجام PCR مقدار۱ میکروگرم cDNA با ۱۰ میکرولیتر 2X Master Mix و۲ میکرولیتر پرایمر اختصاصی راست و ۲ میکرولیتر پرایمر اختصاصی چپ میکس و حجم آن با آب بدون نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد (۳).

تحلیل آماری: داده‌های کمی حاصل با استفاده از نرم-افزار SPSS 22، آزمون آماری One way Anova، t-test و دانت در سطح معناداری $p < ۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل گردید.

جدول -۱ توالی آغازگرها مرتبط با ژن ها

Gene	Forward 5' 3'	Reverse 5' 3'	TM
BMP15	TGCTGACGACCCTACATTGC	CAGCCTCACCATTTTCGCTC	٦۰ °c
Foxo1	TACGCCGACCTCATCATCACC	CACGCTCTTCACCATCCACT	٦۲ °c
GAPDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	٦٦ °c

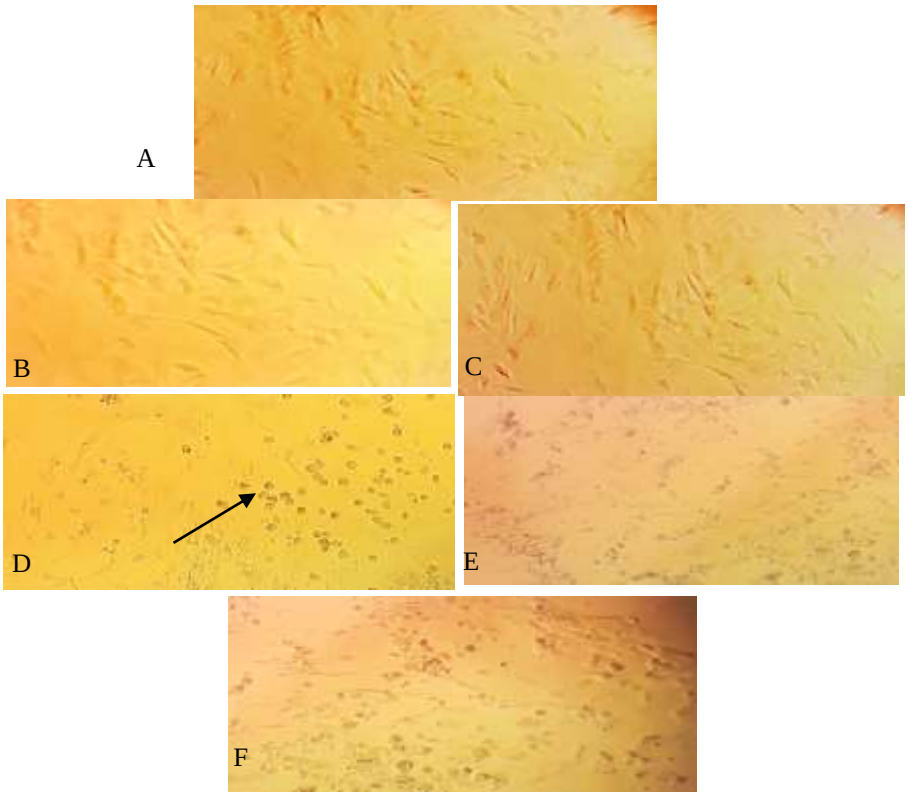
نتایج

آنالیز مورفولوژیکی سلول‌های گرانولواز تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز: تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های گرانولوزا قبل و بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز به دقت توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که در شکل۱ مشاهده می‌شود سلول‌های گرانولوزا تحت تیمار با غلظت‌های ۱۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با عصاره برگ شبدر قرمز نسبت به گروه شاهد بیشترین تکثیر را داشته است و با افزایش غلظت اثر سمیت سلولی عصاره بر روی سلول‌های گرانولوزا محسوس‌تر است به طوریکه در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیمی از سلول‌های گرانولوزا دچار مرگ و میر سلولی شدند که این غلظت نزدیک به غلظت IC50 در تست MTT است.

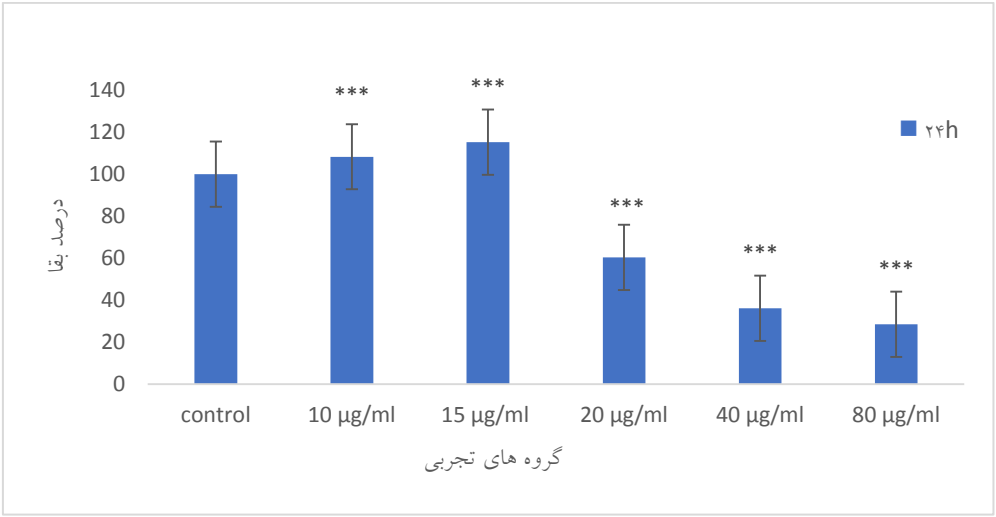
بررسی سمیت سلولی عصاره برگ شبدر قرمز: بررسی نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد غلظت

۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره برگ شبدر قرمز در سطح معناداری $p < ۰/۰۵$ به عنوان غلظت مهاری (IC50) در نظر گرفته شد و در بازه زمانی ۲٤ ساعت بعد از تیمار باعث مهار تکثیر نیمی از سلول‌های گرانولوزا شد. غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلول‌های گرانولواز نسبت به شاهد افزایش معنادار تکثیر را داشته‌اند ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین ممکن است با افزایش غلظت در زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تیمار تاثیر سمیت عصاره بر سلول‌ها باعث افزایش قابل توجهی در مرگ و میر سلول‌ها شده باشد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان داد که دوز تیمار و توانایی زیستی سلول‌های گرانولوزا دارای اثرات متقابل می‌باشند، بدین صورت که غلظت‌های ۱۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین میزان زیستایی سلول را در مقایسه با گروه شاهد دارد و با افزایش میزان غلظت، قابلیت حیات سلول‌ها کاهش نشان داد. *** نشان دهنده معناداری در مقایسه با گروه شاهد است ($p < ۰/۰۰۱$).

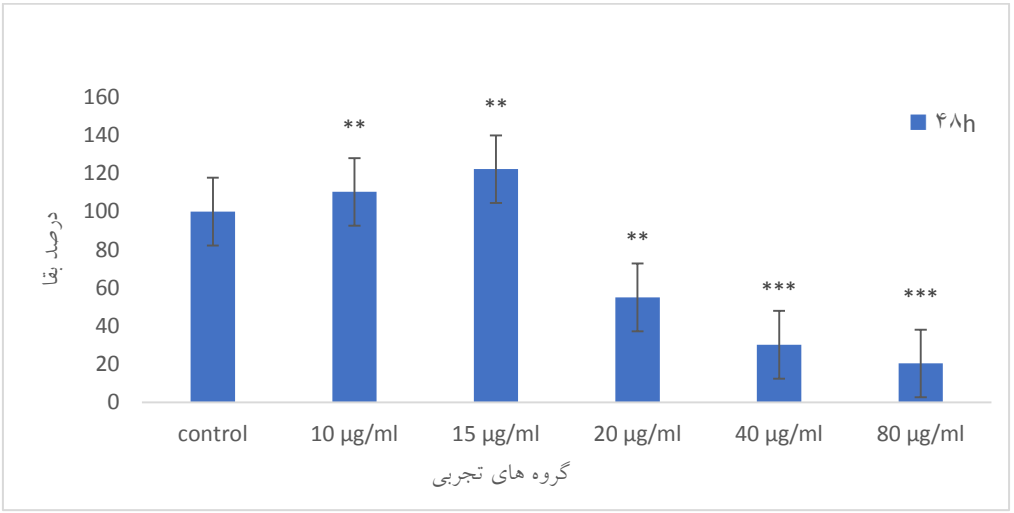
بررسی بیان ژن BMP15 و FOXO1: بررسی نتایج تغییرات سطح بیان ژن FOXO1 وBMP15 در سلول‌های گرانولوزای تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی-لیتر میزان بیان ژن FOXO1 وBMP15 افزایش شدیدی داشته است.



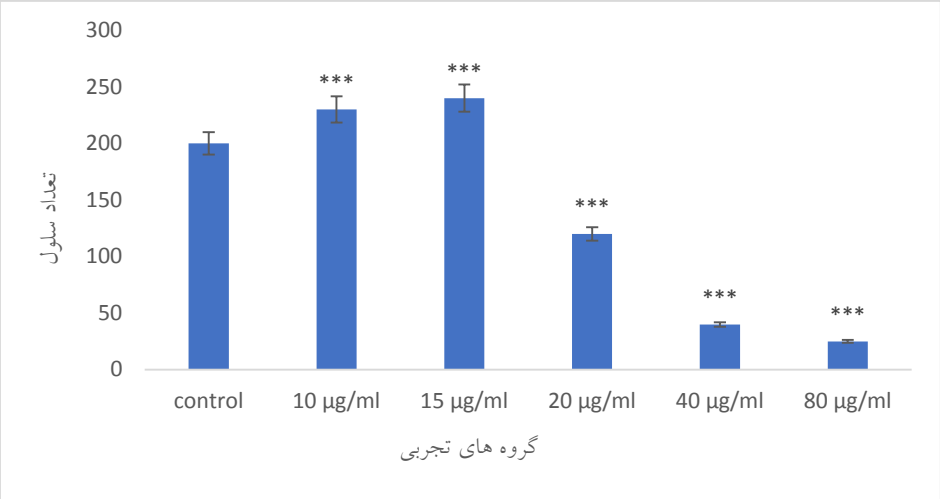
شکل ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز بر مورفولوژی سلول‌های گرانولوزا بعد از ۲٤ ساعت تیمار توسط میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی X۱۰۰). پیکان سفید سلول‌های سالم و پیکان مشکی سلول‌هایی که دچار مرگ و میر سلولی شدند را نشان می‌دهد. A: گروه شاهد (بدون تیمار) B: تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C: تیمار با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر D: تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر E: تیمار با غلظت ٤۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر F: تیمار با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر



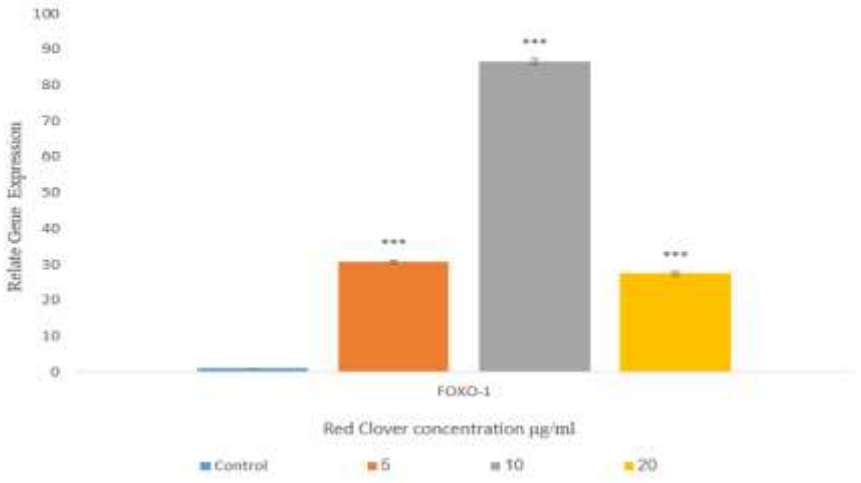
نمودار ۱- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز بر درصد بقای سلولی سلول‌های گرانولوزا طی ۲٤ساعت تیمار نسبت به گروه شاهد بر اساس آزمون MTT. این نمودار نشان می‌دهد اثر کشندگی سلولی عصاره برگ شبدر قرمز وابسته به دوز و زمان است. غلظت ۲۰ µM از عصاره برگ شبدر قرمز منجر به مهار تکثیر نیمی از سلول‌های گرانولواز (IC50) شد و غلظت‌های ۱۵ µM و ۱۰ دارای بیشترین مقدار تکثیر سلول‌های گرانولوزا بعد از گذشت ۲٤ ساعت تیمار با غلظت‌های مورد نظر در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد ($p < ۰/۰۰۱$ ***، Mean ± SD).



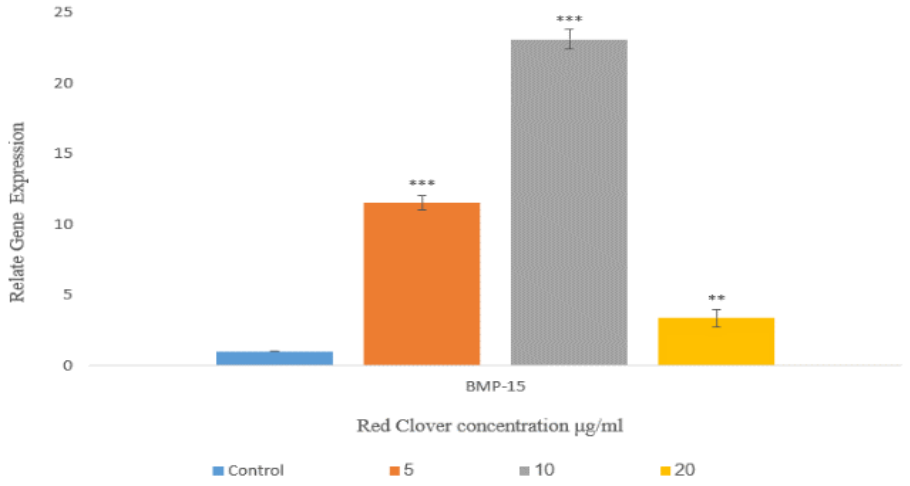
نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز بر درصد بقای سلولی سلول‌های گرانولوزا طی ٤۸ ساعت تیمار نسبت به گروه شاهد بر اساس آزمون MTT. این نمودار نشان می‌دهد اثر کشندگی سلولی عصاره برگ شبدر قرمز وابسته به دوز و زمان است. غلظت ۲۰µM از عصاره برگ شبدر قرمز منجر به مهار تکثیر نیمی از سلول‌های گرانولواز (IC50) شد و غلظت های ۱۵و۱۰ µM دارای بیشترین مقدار تکثیر سلول‌های گرانولوزا بعد از گذشت ٤۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مورد نظر در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد ($p < ۰/۰۰۱$ ***، $p < ۰/۰۱$ **، Mean ± SD).



نمودار ۳- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ شبدر قرمز بر زیستایی سلول‌های گرانولوزا پس از ۲٤ ساعت تیمار به روش رنگ آمیزی تریپان بلو. غلظت‌های ۱۵و۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش زیستایی سلول را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد به طوریکه با افزایش میزان غلظت، قابلیت حیات سلول‌ها کاهش پیدا کرد ($p < ۰/۰۰۱$ ***).



نمودار ٤- بررسی بیان ژن FOXO1 تحت تیمار با عصاره برگ شبدر قرمز در مقایسه با گروه شاهد. بیان ژن FOXO1 در غلظت ۱۰µg/ml نسبت به شاهد به صورت معنا داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۰۱$ ***).



نمودار-۵ بررسی بیان ژن BMP15 تحت تیمار با عصاره برگ شبدر قرمز در مقایسه با گروه شاهد. بیان ژن BMP15 در غلظت ۱۰µg/ml نسبت به شاهد به صورت معنا داری افزایش یافته است (***P<0.001).

بحث

یکی از مهم‌ترین مشکلات جوامع امروز ناباروری است که با استفاده از طب مکمل در کنار طب مدرن می‌توان تا حدودی با کاهش عوارض جانبی به درمان پرداخت (۸). از ترکیبات مناسب، عصاره‌های گیاهی هستند که دارای پتانسیل‌های مناسبی از آنتی اکسیدان‌ها هستند. در این راستا عصاره برگ شبدر قرمز با خواص فیتواستروژنیک خود در غلظت‌های مناسب مورد توجه در مطالعات ناباروری است. در پژوهش حاضر اثر عصاره برگ شبدر قرمز بر بیان ژن‌های فولیکوژنز و تکثیر سلول‌های گرانولوزا در موش ماده بررسی شده است (۱۷). سلول‌های گرانولوزا از طریق کنترل بلوغ اووسیت و تولید هورمون‌های استروئیدی، استرادیول و پروژسترون نقش مهمی در انتخاب، رشد و پشتیبانی فولیکول‌های تخمدان و سیکل تخمدان دارند (۲٤). در همین راستا نتایج مطالعات حاضر، نشان داد که عصاره برگ شبدر قرمز در غلظت ۱۵ و۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش تکثیر سلول‌های گرنولوزا در مقایسه با گروه شاهد شد و از آنجایی که سلول‌های گرانولوزا در محیط کشت قادر به ترشح پروژسترون و استروژن هستند پس احتمالا در این غلظت‌ها افزایش هورمون‌های استروئیدی، پروژسترون، استروژن که به عنوان فاکتورهای بقاء سلول گرانولوزا عمل می‌کنند را داشته است (۹). همچنین مطالعات نشان می‌دهد در سنتز استرادیول پستانداران، آروماتاز یک آنزیم ضروری برای تولید استرادیول در سلول‌های گرانولوزای تخمدان است. این آنزیم آندروژن را به استروژن تبدیل می‌کند. از این رو فلاونوئیدها که از ترکیبات موجود در شبدر قرمز هستند تولید آروماتاز را در سلول‌های گرانولوزا به صورت وابسته به دوز مهار می‌کند (۳۰). استرادیول در تحریک بیان FSH از راه افزایش ظرفیت، تمایز سلول‌های گرانولوزا را تعدیل می‌کند (۱۲). گنادوتروپین‌ها (LH و FSH) و فاکتورهای رشد داخل تخمدانی که به صورت موضعی تولید می‌شوند ساخت و آترزی فولیکول و تعدیل می‌کند (۲۵). در مطالعه حاضر مشخص شد عصاره برگ شبدر قرمز در غلظت‌های ٤۰ و۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مرگ و میر سلول‌های گرانولوزا شده است. در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱٤ Shen و همکارانش نقش FOXO1 را در اثرات

هورمون تحریک کننده‌ی فولیکول در مهار آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزای موشی را مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که FSH با استفاده از هماهنگ کردن محورPKA-PI3K-AKT-FOXO1 و فیدبک مثبت FOXO1-FOXO1 آپوپتوز وابسته به FOXO1 را در سلول‌های گرانولوزا کاهش می‌دهد (۲۸). از طرفی Matsuda و همکاران مشخص کردند که سطح FOXO1 در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های در حال رشد افزایش می‌یابد این مطالعه در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ شبدر قرمز بیشترین افزایش معنادار را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (۱۸). از آنجایی که سطح بیان BMP15 در تخمک‌ها برای باروری زنان کارآمد و ضروری و برای تکوین فولیکول‌ها مناسب است لذا در پژوهش حاضر ژن BMP15 به عنوان مارکرهای رشد و بلوغ اووسیت مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد بیان ژن BMP15 در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ شبدر قرمز بیشترین افزایش را نسبت به گروه شاهد داشته که می‌تواند در تکوین فولیکول‌ها و باروری پستانداران موثر باشد (۲۵). در پژوهشی دیگر که توسط نقی‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ انجام گرفت مشخص شد که ژن BMP15 در باروری و دوقلوزایی نقش بسزایی دارد (٤).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر آن است که عصاره برگ شبدر قرمز در غلظت‌های ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر باعث مهار رشد و مرگ و میر سلول‌های گرانولوزا شد و در غلظت‌های کمتر باعث افزایش رشد سلول‌های گرانولوزا می‌شود. همچنین در به کارگیری عصاره برگ شبدر قرمز می‌بایست به غلظت مورد استفاده بطور کامل توجه نموده. لذا با رعایت این نکات می‌توان پیشنهاد کرد که مطالعه بر روی عصاره برگ شبدر قرمز و ترکیبات موثره آن می‌تواند در مطالعات کلینیکی مورد توجه بسیار بیشتری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این پژوهش همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

1. Abdi S., Salehnia M., Hosseinkhani S., 2013. Comparison of Survival and Developmental rates of Mouse Ovarian Follicles after Two and Three Dimensional Cultures. *Pathobiology Research*, 16(2): 51-63. [In Persian]

2. Amini E., Nabiuni M., Baharara J., Behzad S., Seyfi D., Salek F., 2019. Investigating the anticancer effect of Lippia citriodora leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression. *Journal of Cell and Tissue*, 10(1): 24-33. [In Persian]

3. Ajami A. R., Tehranipour M., Nezhad Shahrokh Abadi, K. H., Zokaee M., 2016. Effects of Cantharellus Cibarius Hydro-Alcoholic Extract on NT3, NGF Gene Expression after Sciatic Nerve Compression in Rats. *SSU_Journals*, 24(8): 679-689. [In Persian]

4. Alinaghizadeh H., Mohammadabadi M. R., Zakizadeh S., 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(1): 69-80. [In Persian]

5. Baharara J., MoosaviFar N., Jalali M., 2008. Effects of HMG & r-FSH on development of ovarian follicles of Balb/C mouse. *Feyz*, 12(1): 1-8. [In Persian]

6. Hidalgo L.A., Chedraui P. A., Morocho N., Ross S., San Miguel G., 2005. The effect of red clover isoflavones on

systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine*, 9(12): e1001356.

14. Mirzaee Z., Dehghan G. R., 2016. The relationship between the antioxidant activity with different amounts of phenolic compounds. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*, 27(4): 321-329. [In Persian]

15. Mueller M., Hobiger S., Jungbauer A., 2010. Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor α and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Menopause*, 17(2): 379-387.

16. Monsefi M., Nadi A., Alinejad Z., 2017. The effects of Salvia officinalis L. on granulosa cells and in vitro maturation of oocytes in mice. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 15(10): 649. [In Persian]

17. Macía M. J., García E., Vidaurre P. J., 2005. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2): 337-350.

18. Matsuda F., Inoue N., Maeda A., Cheng Y., Sai T., Gonda H., Manabe N., 2010. Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Journal of Reproduction and Development*, 57(1): 151-8.

19. Parandin R., Ghorbani R., Sadeghipour Roodsari H. R., 2011. Effects of alcoholic extract of Achillea Millefolium flowers on fertility parameters in male rats. *SSU Journals*, 19(1): 84-93. [In Persian]

20. Pourmoradi S., Jafari A. A., 2015. 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*, 22(1): 121-130. [In Persian]

21. Pakalapati G., Li L., Gretz N., Koch E., menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynecological Endocrinology*, 21(5): 257-264.

7. Hajebi S., Chehregani Rad A., Lariyazdi, H., 2017. Study of cytotoxic effect of Essential oil of Tymus vulgaris L by MTT and Trypan blue assay on breast cancer cell line MCF-7. *Developmental Biology*, 9(4): 1-12. [In Persian]

8. Heidarifar R., Mehran N., Momenian S., Mousavi S. M., Kouhbor M., Hajiali Gol, A., 2013. A study of the status of use of drug plants and its related factors in Qom city, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 7(4): 95-100. [In Persian]

9. Johnson A. L., Langer J. S., Bridgham J. T., 2002. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology*, 143(9): 3405-3413.

10. Kooti W., Ghasemiboroon M., Ahangarpoor A., Hardani A., Amirzargar A., Asadi-Samani M., Zamani M., 2014. The effect of hydro-alcoholic extract of celery on male rats in fertility control and sex ratio of rat offspring. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 16(4): 43-49. [In Persian]

11. Lipovac M., Chedraui P., Gruenhut C., Gocan A., Kurz C., Neuber B., Imhof M., 2012. The effect of red clover isoflavone supplementation over vasomotor and menopausal symptoms in postmenopausal women. *Gynecological Endocrinology*, 28(3): 203-207.

12. Lindeberg M., Carlström K., Ritvos O., Hovatta O., 2007. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Human Reproduction*, 22(2): 401-406.

13. Mascarenhas M. N., Flaxman S. R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G. A., 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a

26. Rabiei Z., Movahedi E., Rafieian-Kopaei M., Lorigooini Z., 2016. Antidepressant effects of Trifolium pratense hydroalcholic extract in mice. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2(1): 33-24. [In Persian]

27. Sabudak T., Guler N., 2009. Trifolium L–a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(3): 439-446.

28. Shen M., Liu Z., Li B., Teng Y., Zhang J., Tang Y., Liu H., 2014. Involvement of FoxO1 in the effects of follicle-stimulating hormone on inhibition of apoptosis in mouse granulosa cells. *Cell Death and Disease*, 5(10): e1475-e1475.

29. Ulkay M. B., Aktas A., Bozkurt H. H., 2008. The effect of Trifolium pratense L.(red clover) on rat testes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 14(2): 151-155.

30. Zhao E., Mu Q., 2011. Phytoestrogen biological actions on mammalian reproductive system and cancer growth. *Scientia Pharmaceutica*, 79(1): 1-20.

Wink M., 2009. Influence of red clover (Trifolium pratense) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 16(9): 845-855.

22. Parandin R., 2019. Evaluation of anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-pyretic potential of hydroalcoholic extract of Trifolium pratense in mice. *Complementary Medicine Journal of faculty of Nursing & Midwifery*, *9*(1), 3615-3625. [In Persian]

23. Parandin R., 2020. Antidiabtic and Hepatoprotective Effects of Hydroalcoholic Extract of Trifolium pratense in Mice. *Experimental Animal Biology*, 8(3): 101-110. [In Persian]

24. Peirouvi T., Roshan M. S., Salami S., Ghaderi M., Shams A., 2014. Effects of GnRH agonist on follicular granulosa cell apoptosis of rats. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 21(3): 461-476. [In Persian]

25. Paulini F., Melo E. O., 2011. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in domestic animals*, 46(2): 354-361.