

Original Article

Protective Effect of Hydroethanolic Extract of *Lippia citrodora* L. Leaf and Vitamin D3 on Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovary Syndrome in Mice

Naser Mirazi^{1*} , Somayeh Mosalsal¹ , Zahra Izadi² , Alireza Nourian³ 

¹ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

² Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Nahavand, Nahavand, Iran.

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

* **Corresponding Author:** Naser Mirazi; Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Email:
mirazi@basu.ac.ir,
mirazi205@gmail.com

Received: 15 Sep, 2020
Accepted: 02 Nov, 2020

Abstract

Background and Objectives: This study was conducted to investigate the protective effect of hydroethanolic extract of *Lippia citrodora* L. leaf (LCE) and vitamin D3 on polycystic ovary syndrome (PCOS) in suri rats.

Methods: This experimental study was performed on 48 female suri rats with a weight range of 25-35g. The subjects were divided into 8 groups (n=6 each), namely control (food + water), case (estradiol valerate, subcutaneously), sham (sesame oil, 0.25 ml, subcutaneously), positive control (metformin + water), intervention 1 (estradiol valerate + low-dose *Lippia citrodora* L. extract, intraperitoneally), intervention 2 (estradiol valerate + LCE high dose, intraperitoneally), intervention 3 (estradiol valerate + vitamin D3, intraperitoneally), and intervention 4 (estradiol valerate + *Lippia citrodora* L. extract + vitamin D3). The whole process of performing the experiments took 55 days. To conduct the study, blood and ovary tissue samples were obtained from the subjects. The collected data were analyzed in SPSS software (version 24) using the one-way ANOVA method.

Results: Based on the results of the study, estradiol valerate caused PCOS in suri rats. Moreover, a significant decrease of ovarian cysts was observed in the ovarian tissue of the treatment groups, compared to those in the case group. It was also found out the concomitant use of *Lippia citrodora* L. extract and vitamin D3 was more effective in reducing ovarian cysts.

Conclusion: The results of this study showed that the use of *Lippia citrodora* L. extract and vitamin D3 had a significant effect on reducing ovarian cysts in suri rats with PCOS.

Keywords: Cholecalciferol; Estradiol; *Lippia citrodora* L.; Polycystic ovary syndrome; Suri rat.

DOI: 10.29252/qums.14.9.16

مطالعه اثر محافظتی عصاره هیدرواتانولی برگ گیاه به لیمو (*Lippia citrodora L.*) و ویتامین D3 بر سندروم تخمدان پلی کیستیک القا شده با استرادیول والرات در موش های سوری

ناصر میرازی^{۱*}، سمیه مسلسل^۱، زهرا ایزدی^۲، علیرضا نوریان^۳

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر محافظتی عصاره هیدرواتانولی برگ گیاه به لیمو و ویتامین D3 بر موش های مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS: Polycystic ovary syndrome) انجام شد.

روش بررسی: در این پژوهش تجربی، ۴۸ سر موش سوری ماده بالغ در محدوده وزنی ۳۵-۲۵ گرم در هشت گروه شش سری تقسیم شدند که عبارت بودند از: کنترل (فقط آب و غذا)، شاهد (دریافت کننده داروی استرادیول، زیرپوستی)، شم (دریافت کننده روغن کنجد به میزان ۰/۲۵ میلی لیتر، زیرپوستی)، کنترل مثبت (دریافت کننده متفورمین همراه با آب آشامیدنی) و گروه های تیمار: تیمار ۱ (استرادیول والرات + عصاره به لیمو با دوز پایین، درون صفاقی)، تیمار ۲ (استرادیول والرات + عصاره به لیمو با دوز بالا، درون صفاقی)، تیمار ۳ (استرادیول والرات + ویتامین D3، درون صفاقی) و تیمار ۴ (استرادیول والرات + عصاره به لیمو + ویتامین D3). مدت زمان انجام آزمایشات، ۵۵ روز به طول انجامید. برای انجام این مطالعه، نمونه های خون و بافت تخمدان موش ها تهیه شدند. داده ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه ANOVA ارزیابی گردیدند.

یافته ها: یافته های این مطالعه نشان دادند که استرادیول والرات سبب ایجاد کیست های فولیکولی در موش های سوری می شود. در بافت تخمدان گروه های تیمار نسبت به گروه شاهد، کاهش معنادار کیست های تخمدانی مشاهده گردید. بر مبنای یافته ها، استفاده همزمان عصاره به لیمو و ویتامین D3 در کاهش کیست های تخمدانی مؤثرتر عمل می نماید.

نتیجه گیری: نتایج نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه به لیمو و ویتامین D3 تأثیر قابل ملاحظه و معناداری بر کاهش کیست های تخمدانی در موش های مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک دارد.

کلیدواژه ها: استرادیول؛ به لیمو؛ تخمدان پلی کیستیک؛ کوله کلسیفرول؛ موش سوری.

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

^۲ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه نهاوند، نهاوند، ایران.

^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

ناصر میرازی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

mirazi@basu.ac.ir,
mirazi205@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Mirazi N, Mosalsal S, Izadi Z, Nourian A. Protective Effect of Hydroethanolic Extract of *Lippia citrodora L.* Leaf and Vitamin D3 on Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovary Syndrome in Mice. Qom Univ Med Sci J 2020;14(9):16-27. [Full Text in Persian]

مقدمه

عفونت‌های پوستی و مشکلات گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، از به لیمو به دلیل اثرات ضد اسپاسم، ضد پیری و آرام‌بخشی آن به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. اجزای اصلی این گیاه از چندین اکسیدوئید، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و فنیل پروپانوئیدها به ویژه ورباسکوزید به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قدرتمند تشکیل شده است. ورباسکوزید فراوان‌ترین ماده تشکیل‌دهنده عصاره به لیمو بوده و دارای اثرات دارویی متنوعی از جمله اثر ضد باکتریایی، ضد فشار خون، آنتی‌اکسیدان و همچنین افزایش یادگیری و بهبود حافظه می‌باشد (۹). ویتامین D3 یکی از هورمون‌های استروئیدهای ساخته شده در بدن و در معرض اشعه فرابنفش نور خورشید (UV: Ultraviolet) می‌باشد. این ویتامین نقش فیزیولوژیک مهمی در تولید مثل، رشد و تکوین فولیکول‌های تخمدانی و تشکیل جسم زرد دارد. علاوه بر این، سیستم پیام‌رسانی سلولی باعث تغییر هورمون ضد مولری، حساسیت به هورمون محرک فولیکولی (FSH: Follicle-stimulating hormone) و تولید پروژسترون در سلول‌های گرانولوزای انسانی می‌شود (۱۰). ویتامین D3 در هومئوستاز گلوکز با روند افزایش گیرنده‌های ویتامین D3 در سلول‌های بتای پانکراس و سلول‌های عضلات اسکلتی نقش دارد. همچنین این ویتامین در بیان ژن آنزیم ۱-آلفا هیدروکسیلاز که موجب تبدیل ۲۵-هیدروکسی ویتامین D به ۱،۲۵-دی‌هیدروکسی ویتامین D ایفای نقش می‌کند (۱۱). با توجه به اهمیت گیاه به لیمو در صنایع داروسازی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی و نیز از آنجایی که تاکنون پژوهش دقیقی در مورد اثر محافظتی عصاره به لیمو و ویتامین D3 به طور همزمان بر پیشگیری از سندرم تخمدان پلی کیستیک صورت نگرفته است، در پژوهش حاضر به بررسی این مهم پرداخته شد.

روش بررسی

در مطالعه تجربی حاضر، ۴۸ سر موش سوری ماده در محدوده وزنی ۲۵-۳۵ گرم مورد بررسی قرار گرفتند. باید خاطر نشان ساخت که در این مطالعه کلیه موارد اخلاقی در پژوهش رعایت شده و تمامی اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها در حیوانات تحت بیهوشی کامل صورت گرفته است. همچنین سعی شده است تا از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود. لازم به ذکر می‌باشد

سندروم تخمدان پلی کیستیک شایع‌ترین علت ناباروری از نوع عدم تخمک‌گذاری است که ناباروری حاصل از آن، ۴۰ درصد از بیماران PCOS را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تقریباً ۹۵-۹۰ درصد از زنان دچار عدم تخمک‌گذاری که به کلینیک ناباروری مراجعه می‌کنند، به PCOS مبتلا می‌باشند (۱). چاقی شکمی، پروفایل نامطلوب لیپید، مقاومت به انسولین به ویژه در افراد چاق و با سابقه خانوادگی مثبت در دیابت، تنها چند نمونه از عوامل خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در بیماران PCOS می‌باشند (۲). در این زمینه، اخیراً سندروم PCOS از سوی فدراسیون بین‌المللی دیابت و انجمن دیابت آمریکا به عنوان یک عامل خطر ساز غیر قابل تغییر و مهم در ارتباط با دیابت نوع ۲ شناخته شده است (۳). دیس‌لیپیدی در ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به PCOS در ایالات متحده رخ می‌دهد. شایع‌ترین ویژگی‌های دیس‌لیپیدی آتروژنیک در PCOS عبارت هستند از: هاپیر تری‌گلیسیریدی، افزایش سطح سرمی لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL: Low-density lipoprotein) و کاهش سطح سرمی لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL: High-density lipoprotein) (۴). به نظر می‌رسد عوامل خطر ساز مهم برای ایجاد آترو اسکلروز، افزایش فشار خون و انفارکتوس میوکارد در سن پایین‌تری در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک نسبت به زنان غیر مبتلا به این سندرم رخ می‌دهد (۵). براساس شیوع این عوامل خطر، ابتلا به بیماری قلبی- عروقی در زنان مبتلا به PCOS، ۴ تا ۱۱ برابر بالاتر است (۶). ارتباط بین PCOS و سرطان آندومتر رحم ابتدا در سال ۱۹۴۹ پیشنهاد شد (۷). در این راستا، برخی از عوامل خطر بالینی، متابولیکی و مولکولی عبارت هستند از: استفاده طولانی مدت از استروژن‌های غیر طبیعی، چاقی، فشار خون بالا، مقاومت در برابر انسولین، فاکتورهای رشد شبه انسولینی، دیابت، ناباروری، نولی پاریتی، سیکلین D1، گلوکوتائون-S-ترانسفراز و مقاومت در برابر پروژسترون (۸). گیاهان دارویی برای پیشگیری و یا درمان برخی از ناهنجاری‌ها و بیماری‌ها از دیرباز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان، به لیمو می‌باشد. به لیمو (با نام علمی *Lippia citrodora* L.) به طور گسترده‌ای برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله تب، سرماخوردگی،



درآمدند. پودر به دست آمده در ظرف حاوی الکل اتیلیک ۸۰ درصد (به نسبت ۸۰ میلی لیتر الکل اتیلیک + ۱۶ میلی لیتر آب مقطر) قرار داده شد؛ به طوری که پودر گیاه به طور کامل در الکل مذکور غوطه ور گردید. ظرف حاوی الکل ۸۰ درصد و پودر به لیمو به مدت یک هفته در یخچال قرار گرفت. پس از این مدت، محتوای ظرف توسط کاغذ صافی صاف گردید و با استفاده از دستگاه روتاری (IKA RV10 digital) با دمای ۵۵ درجه و با شدت ۶۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. عصاره در هود به مدت ۴۸ ساعت به حالت خشک درآمد و تا زمان مصرف در فریزری با دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. از عصاره تغلیظ شده به لیمو و عصاره رقیق شده با نرمال سالین، دوزهای ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه شد و به صورت داخل صفاقی روزانه (ساعت ۱۰ صبح از روز صفر تا روز پنجاه و پنجم) تجویز گردید.

روش خونگیری

پس از پایان آزمایشات، به منظور نمونه گیری خون و بافت تخمدان، ابتدا حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس ناحیه شکم و قفسه سینه آن‌ها با قیچی جراحی شکافته شد. خونگیری توسط سرنجک به طور مستقیم از قلب حیوان انجام شد. نمونه‌های خون در لوله‌های آزمایش استریل ریخته شدند و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در ادامه، سرم آن‌ها جدا شد. سرم‌ها برای انجام آزمایشات مورد نظر به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌های تخمدان نیز از هر موش توسط قیچی جراحی برداشته شدند و بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد تا برای انجام مقطع گیری و رنگ آمیزی بافتی مورد استفاده قرار گیرند. آزمایشات هورمونی در آزمایشگاه توسط دستگاه الیزا ریدر (ELISA Reader-BioTek instrument, USA) انجام شد.

تهیه مقاطع بافت‌شناسی

پس از برداشت بافت تخمدان، نمونه‌ها در لوله‌ای حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، فرمالین تعویض گردید. تمامی مراحل مربوط به تهیه مقاطع بافتی شامل:

که ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا با کد IR.BASU.REC.1398,036 مورد تصویب قرار گرفت. موش‌ها پس از خریداری شدن از دانشگاه علوم پزشکی همدان به اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا منتقل شدند و به مدت یک هفته در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا قرار گرفتند. سپس در هشت گروه شش سری به طور تصادفی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱. کنترل (بدون درمان و دسترسی آزادانه به آب و غذا)
۲. کنترل مثبت (مبتلا به PCOS + متفورمین، ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)
۳. شاهد (مبتلا به PCOS)
۴. شم (روغن کنجد، ۰/۲۵ میلی لیتر زیرپوستی)
۵. تیمار ۱ (مبتلا به PCOS + عصاره به لیمو؛ ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)
۶. تیمار ۲ (مبتلا به PCOS + عصاره به لیمو؛ ۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)
۷. تیمار ۳ (مبتلا به PCOS + ویتامین D3)
۸. تیمار ۴ (مبتلا به PCOS + عصاره به لیمو؛ ۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن + ویتامین D3)

ایجاد PCOS در موش

سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) در موش‌ها با استفاده از داروی استرادیول والرات با دوز ۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه روغن کنجد با حجم ۰/۲۵ میلی لیتر به صورت تزریق زیرپوستی در ناحیه بین دو کتف به شکل تک دوز ایجاد شد. پس از گذشت ۵۵ روز، موش‌ها به PCOS مبتلا شدند (۱۲). ویتامین D3 (۳۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت درون صفاقی تزریق گردید (۱۰).

تهیه عصاره برگ گیاه به لیمو

ابتدا ۳ کیلوگرم برگ گیاه به لیمو از گلخانه گیاهان دارویی دانشگاه نهاوند تهیه شد و در شرایط کاملاً بهداشتی و در سایه خشک گردید. سپس برگ‌ها با استفاده از آسیاب به صورت پودر

آنالیز آماری اطلاعات و مقایسه میانگین گروه‌های تحت مطالعه پس از بررسی پیش‌فرض‌های اساسی استفاده شد. از آزمون تعقیبی توکی نیز استفاده گردید. سطح معناداری معادل ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

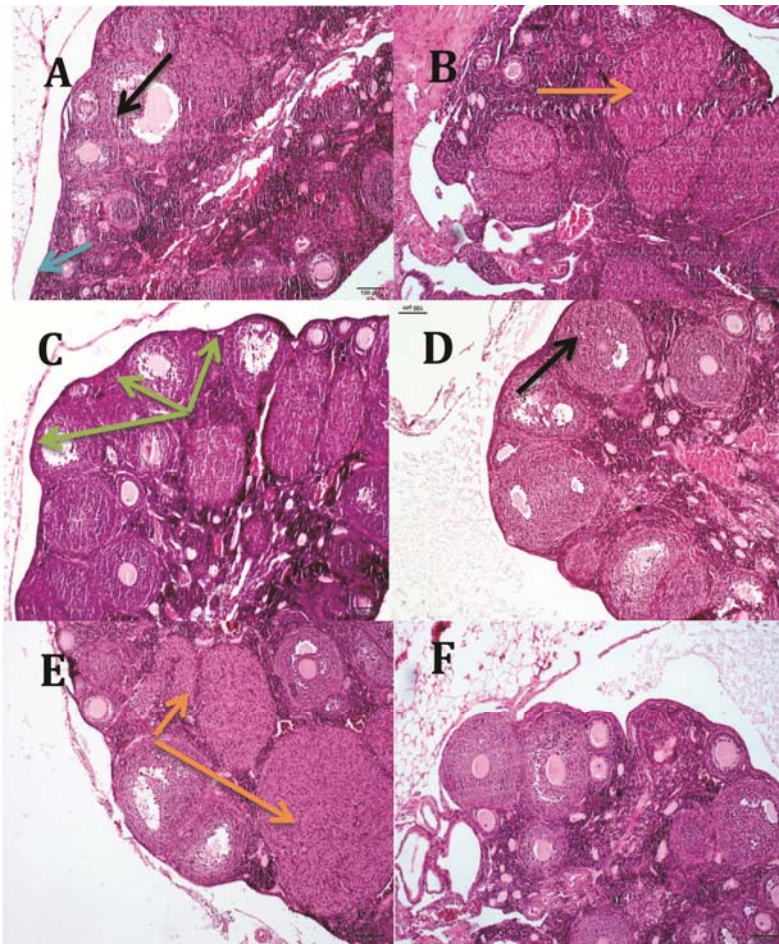
بافت‌شناسی

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن می‌باشند که تزریق استرادیول والرات به صورت زیرپوستی در گروه شاهد در طول آزمایش نسبت به گروه کنترل منجر به بروز سندرم تخمدان پلی کیستیک در موش‌ها گردیده است (شکل ۱). بر مبنای نتایج استفاده از

شستشوی بافت، آب‌گیری، شفاف کردن، آغشته‌سازی و قالب‌گیری با استفاده از پارافین مذاب انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند. برای رنگ‌آمیزی از هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گردید. سپس لام‌های حاوی اسلایدهای بافتی توسط میکروسکوپ نوری (Axioskop 2- mot plus- Carl Zeiss, Germany) مورد مطالعه قرار گرفتند. مدت زمان انجام این مطالعه، ۵۵ روز به طول انجامید.

روش بررسی آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 از نظر آماری ارزیابی شدند. از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها و از آزمون واریانس یک طرفه ANOVA برای



شکل شماره ۱: مقاطع بافت‌شناسی تهیه شده از تخمدان‌های موش‌های سوری مورد بررسی: A: گروه کنترل: فولیکول‌های تخمدانی در مراحل مختلف رشد، فولیکول اولیه (پیکان آبی) و فولیکول‌های رسیده (پیکان سیاه) کاملاً سالم و فاقد کیست تخمدانی می‌باشند؛ B: کنترل مثبت: فولیکول‌های تخمدانی وجود داشته و کیست تخمدانی مشاهده نمی‌شود؛ اما جسم زرد طبیعی وجود دارد (پیکان نارنجی)؛ C: شاهد: تخمدان دارای کیست‌های متعدد (پیکان سبز) به همراه برخی از فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد می‌باشد؛ D: تیمار ۲: تخمدان دارای انواع فولیکول‌ها می‌باشد. تعداد کمی کیست تخمدانی نیز مشاهده می‌گردد؛

E: تیمار ۳: تخمدان با کیست اندک و دارای فولیکول‌های تخمدانی طبیعی می‌باشد که در مراحل مختلف رشد قرار دارند؛ F: تیمار ۴: تخمدان بدون کیست بوده و دارای فولیکول‌های تخمدانی طبیعی می‌باشد که در مراحل مختلف رشد قرار دارند. رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰X در نظر گرفته شده است.

گروه‌های مورد بررسی مشاهده گردید که میزان این هورمون در گروه شاهد نسبت به گروه‌های کنترل، کنترل مثبت، تیمار ۴ و شم (P<۰/۰۰۱) و در گروه تیمار ۲ (P<۰/۰۰۱) کاهش معناداری داشته است؛ در حالی که میزان سطح سرمی این هورمون در گروه‌های تیمار شده با عصاره به لیمو، ویتامین D3 و مصرف توآمان این ویتامین و عصاره، هیچ‌گونه اختلاف معناداری را نشان نداد (نمودار ۲).

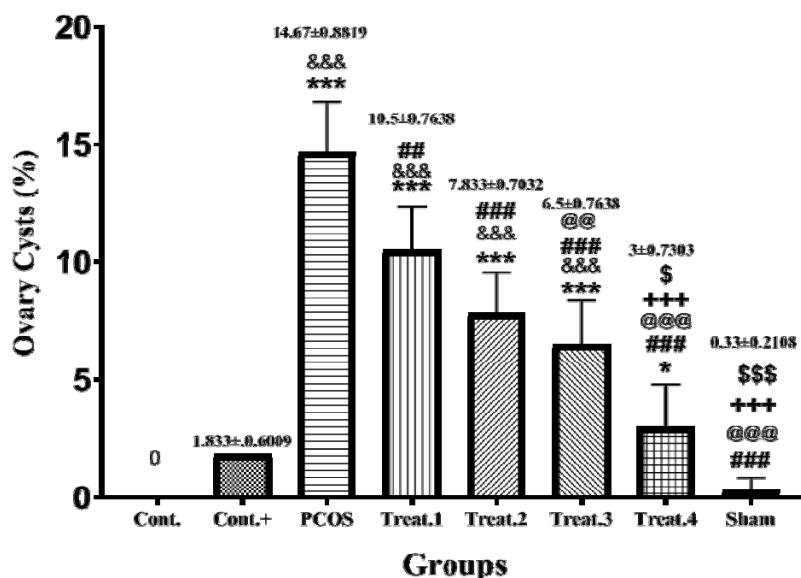
سنجش میزان هورمون LH (Luteinising hormone) در سرم خون موش‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که میزان این هورمون در گروه شاهد نسبت به گروه‌های کنترل و کنترل مثبت، افزایش معنادار داشته (P<۰/۰۰۱) و نسبت به سایر گروه‌های تیمار و شم با افزایش معنادار همراه بوده است (P<۰/۰۰۱). این در حالی می‌باشد که میزان سطح سرمی این هورمون در گروه‌های تیمار، شم و کنترل مثبت، فاقد هرگونه اختلاف معنادار با گروه کنترل بودند (نمودار ۳).

با بررسی میزان سطح سرمی هورمون تستوسترون در خون موش‌های گروه‌های مورد بررسی چنین نتیجه گرفته شد که میزان سطح سرمی این هورمون در گروه شاهد، افزایش معناداری نسبت

داروی متفورمین در گروه کنترل مثبت، تأثیر معناداری نسبت به گروه کنترل بر گروه‌های تیمار ۲، ۳ و ۴ نداشته است. همچنین مصرف عصاره برگ به لیمو در تیمارهای انجام شده به صورت همزمان با تجویز استرادیول والرات موجب کاهش تعداد کیست‌ها نسبت به گروه شاهد گردیده است. تعداد کیست‌های تخمدانی در گروه شاهد افزایش معناداری (P<۰/۰۰۱) را نشان می‌دهند؛ در حالی که در گروه‌های تیمار، تعداد کیست‌های تخمدانی به ویژه در گروه تیمار ۴ به میزان قابل توجه و معناداری کاهش یافته است (نمودار ۱). همچنین مصرف ویتامین D باعث کاهش معنادار (P<۰/۰۰۵) تعداد کیست‌های تخمدانی شده است. بر مبنای نتایج می‌توان گفت که مصرف توآمان ویتامین D و عصاره برگ به لیمو سبب عدم ایجاد کیست تخمدانی در موش‌های تحت تیمار گردیده است. استفاده از روغن کنجد در گروه شم تأثیر معناداری بر تعداد فولیکول‌ها و ایجاد تغییرات کیستیک قابل ملاحظه در فولیکول‌ها نسبت به گروه کنترل داشته است.

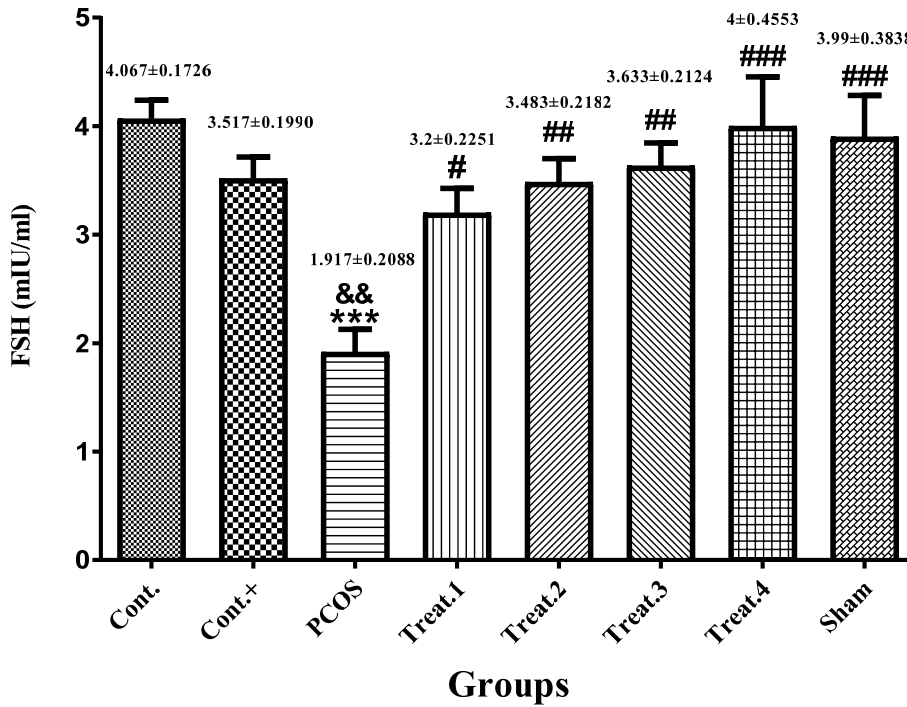
هورمونی

در آزمایشات به عمل آمده از سنجش سطح سرمی FSH در

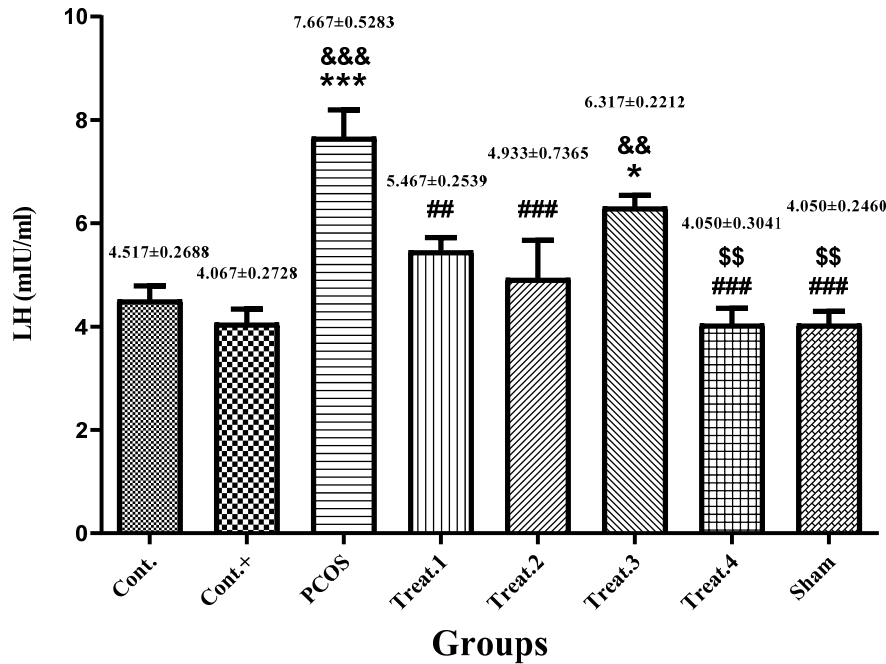


نمودار شماره ۱: مقایسه درصد کیست‌های تخمدانی در گروه‌های مورد آزمون با استفاده از روش ANOVA (n=6)

* نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل؛ & نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت؛ # نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد؛ @ نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱؛ + نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۲؛ \$ نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۳
 \$\$\$ P</0.001, \$ P</0.05, +++ P</0.001, &&& P</0.001, ## P</0.01, ### P</0.001, @@@ P</0.001, @@ P</0.01, * P</0.05, *** P</0.001

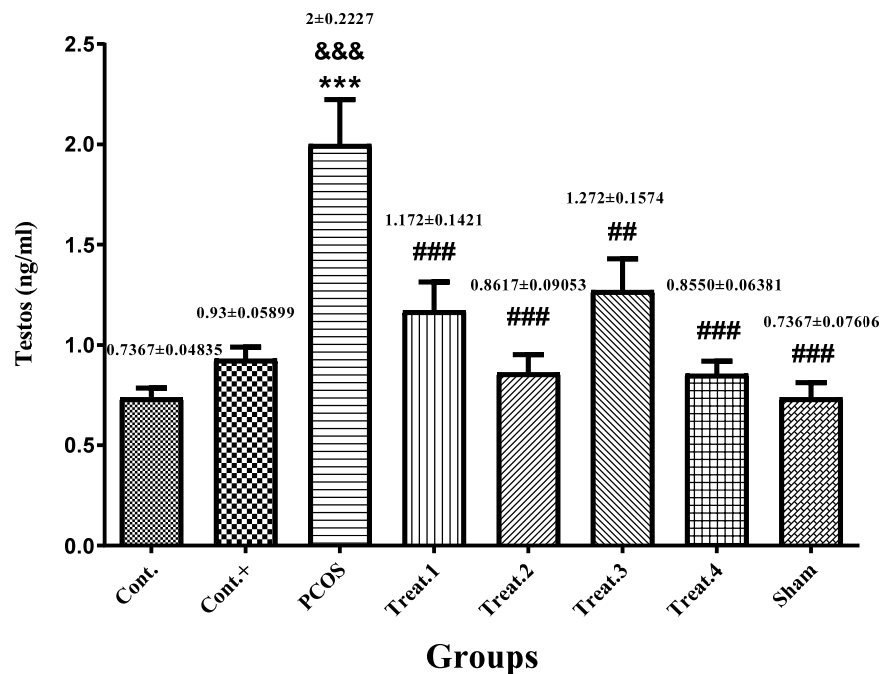


نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین سطح سرمی FSH در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش ANOVA (n=6)
 * نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل؛ & نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت؛ # نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد
 ### P</0.001, ## P</0.01, # P</0.05, && P</0.01, *** P</0.001



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین سطح سرمی هورمون LH در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش ANOVA (n=6)

* نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل، & نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت، # نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد، \$
نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۳
\$P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, &&P < 0.001, &&&P < 0.001, ##P < 0.01, ###P < 0.001, \$\$\$P < 0.001



نمودار شماره ۴: مقایسه میانگین سطح سرمی هورمون تستوسترون در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش ANOVA (n=6)
* نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل؛ & نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل مثبت؛ # نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد
\$P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, &&P < 0.001, &&&P < 0.001, ##P < 0.01, ###P < 0.001, \$\$\$P < 0.001

هورمون با گروه‌های شاهد، تیمار ۱ و تیمار ۳ کاملاً آشکار و معنادار می‌باشد ($P < 0.001$) (نمودار ۵).

بحث

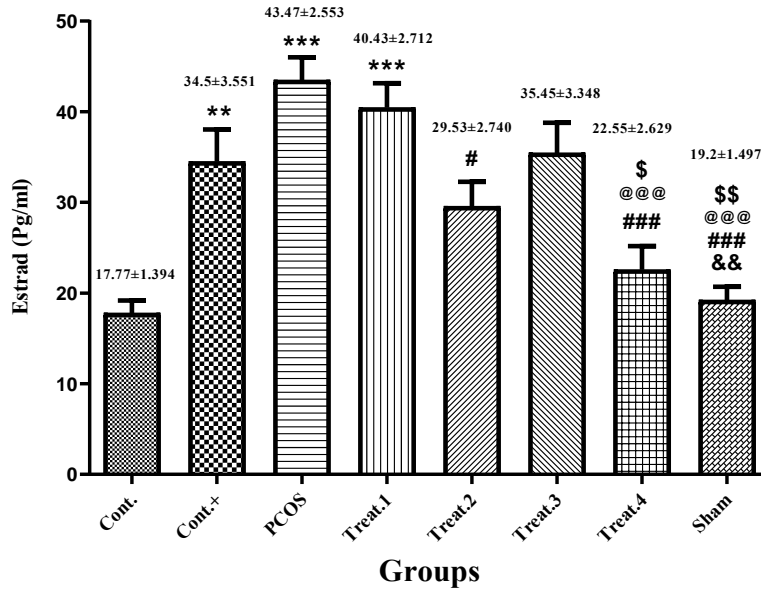
وجود ویتامین‌ها و کاروتنوئیدهای نظیر کوئرستین (Quercetin) در گیاه به لیمو به اثبات رسیده است و شاید این مواد موجب کاهش اختلالات ایجاد شده در PCOS توسط آن‌ها شده باشد. کوئرستین گلیکوزیدی متشکل از کاروتنوئیدی به نام کروستین و قند است که در سنتز رنگ زعفران شرکت می‌کند. کوئرستین مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX: Cyclooxygenase) و لیبواکسیژناز (LOX: Lipoxigenases) را انجام داده و سبب مهار تولید پروستاگلاندین‌ها می‌شود. این عمل رفع التهاب در بافت‌ها را به دنبال دارد (۱۳). برخی از گزارشات بیان‌کننده این موضوع هستند که کوئرستین، تولید $TNF-\alpha$ القا شده توسط لیپوپلی ساکارید در ماکروفاژها و نیز تولید اینترلوکین ۸ (IL-8) القاشده توسط لیپوپلی ساکارید در سلول‌های A549 رویی را مهار

به گروه کنترل، کنترل مثبت، تیمار ۱، تیمار ۲، تیمار ۴، شم ($P < 0.001$) و تیمار ۳ ($P < 0.01$) داشته است؛ در حالی که میزان سطح سرمی این هورمون در تمام گروه‌های تیماری، شم و کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل و با یکدیگر فاقد هرگونه اختلاف معنادار می‌باشد (نمودار ۴).

سنجش سطح سرمی هورمون استرادیول در گروه‌های مورد آزمون نشان داد که میزان این هورمون در موش‌های گروه‌های شاهد و تیمار ۱ ($P < 0.001$) و در گروه کنترل مثبت ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری بودند. همچنین استفاده از عصاره به لیمو توانسته است میزان این هورمون را در گروه‌های تیمار ۲، ۳، ۴ و شم به میزان قابل توجه و معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. شایان ذکر است که در گروه‌های تیمار ۴ و شم، هیچ‌گونه اختلاف معناداری در سطح سرمی این هورمون با یکدیگر و با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. این در حالی است که اختلاف ایجاد شده در سطح سرمی این

به طور معناداری بیان ژن و تولید گاما اینترفرون مشتق شده از سیتوکین تیپ ۱ (Th-1) را افزایش می‌دهد و موجب تنظیم

می‌نماید (۱۴). با توجه به مکانیسم‌های فوق به نظر می‌رسد که نقش ضد التهابی کوئرستین در بدن بسیار اهمیت دارد. کوئرستین



نمودار شماره ۵: مقایسه میانگین سطح سرمی هورمون استرادیول در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش ANOVA (n=6)

* نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل؛ # نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد؛ \$ نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۲؛ @ نمایانگر

اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۱؛ & نمایانگر اختلاف معنادار نسبت به گروه تیمار ۳

*** P<0.001, ** P<0.01, # P<0.05, \$\$\$ P<0.001, @@@ P<0.001, && P<0.01, \$\$ P<0.01, \$ P<0.05, ### P<0.001, ## P<0.01, & P<0.05, @ P<0.05

و همکاران در مطالعات خود نشان دادند که سطح سرمی هورمون FSH در موش‌های مورد بررسی کاهش معنادار و هورمون LH افزایش معنادار داشته است. افزایش سطح هورمونی LH، ناشی از تأثیر هورمون استرادیول والرات بر هیپوتالاموس و از بین رفتن نوسانات ترشحی آن دانسته شده است. ترشح تستوسترون در موش‌های PCOS سبب اثر بازخوردی منفی بر ترشح گونادوتروپین‌ها بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی آن عنوان شده است. وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاه به لیمو (۹) مانع از تغییرات هورمونی در موش‌ها شده و تعادل هورمونی را در موش‌های تیمار شده PCOS برمی‌گرداند (۱۸). وجود منابع سرشار و غنی از آنتی‌اکسیدان در به لیمو می‌تواند نقشی اساسی در بهبود بسیاری از ناهنجاری‌ها از جمله PCOS داشته باشد (۱۹). مطالعات متعددی به نقش ویتامین D3 در روند تولید مثل، هیپوگنادیسم، چاقی و ناباروری در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک اشاره نموده‌اند (۲۰). گیرنده‌های ویتامین D3 در تخمدان، آندومتر، جفت و بیضه‌ها بیان گشته و تصور می‌شود که

کاهشی تولید اینترلوکین ۴ مشتق شده از سیتوکین تیپ ۲ (Th-2) می‌شود. این روند سبب افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش اینترلوکین ۴ می‌گردد؛ در نتیجه، این اعمال اثرات مفید کوئرستین بر مهار التهاب را در پی خواهند داشت (۱۵). کوئرستین به مقدار قابل ملاحظه‌ای در عصاره به لیمو وجود دارد (۱۶). باید خاطر نشان ساخت که کوئرستین، کاهش LH و تعدیل هورمون‌های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان را انجام می‌دهد و باعث بهبود علائم بافتی تخمدان از قبیل افزایش تعداد فولیکول‌های در حال تکوین نظیر فولیکول‌های پری‌آنترال، آنترال و همچنین جسم زرد شده و از سوی دیگر موجب کاهش تعداد فولیکول‌های کیستیک می‌شود (۱۶). ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد التهابی نظیر کوئرستین موجب درمان PCOS و تنظیم چرخه‌های قاعدگی می‌گردند (۱۷). در این پژوهش نشان داده شد که سطح سرمی هورمون FSH در خون موش‌های گروه PCOS بدون تیمار با اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. در این راستا، غفوریان

تیمار نسبت به گروه شاهد را به همراه داشت. علت این مهم می‌تواند وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر لیمونن، سینئول و سیتروول باشد (۲۷). پژوهشگران در سال ۱۹۷۶ توانستند اثبات کنند که گیاه به لیمو حاوی موسیلاژ، اسانس، تانن هیدرولیز شونده، فنل‌های اسیدی، فلاونوئید و آلکالوئید می‌باشد (۲۸). از برگ گیاه به لیمو، ۱۳ فلاونوئید جداسازی گشته، تعیین ساختمان و نامگذاری شده است (۲۹). طی پژوهشی دیگر از ساقه‌های این گیاه استیگماسترول، بتا-آمیرین، بتا-سیتوسترول، مونو استات و بنزوات جدا گردید (۳۰). تمام مواد فوق دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. این خواص آنتی‌اکسیدانی، فعالیت قوی برای گیر انداختن رادیکال‌های سوپراکسید و فعالیت متوسطی برای به دام اندازی رادیکال‌های هیدروکسیل دارند. به لیمو به واسطه برخورداری از ترکیبات فلاونوئیدی از طریق رابطه متقابل با رسپتورهای گابا در کاهش اضطراب مؤثر می‌باشد (۳۱). وجود مواد ذکر شده در گیاه به لیمو و اثرات سینرژیستی آن‌ها با ویتامین D3 در حذف مواد آسیب‌رسان بافتی و ترکیبات اکسیدکننده‌ای که در تخمدان‌های مبتلا به سندرم PCOS ایجاد شده‌اند، می‌تواند در درمان تخمدان آسیب‌دیده در PCOS مؤثر واقع شود.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر آن بودند که استرادیول والرات قادر است در موش‌های سوری ماده منجر به ایجاد سندرم تخمدان پلی کیستیک شود. همچنین استفاده از عصاره برگ گیاه به لیمو در دوزهای متفاوت می‌تواند نقش مثبتی را در بهبود این سندرم ایفا نماید. از سوی دیگر، ویتامین D3 به تنهایی و همراه با عصاره برگ گیاه به لیمو، اثرات سینرژیستی بر پیشگیری از سندرم تخمدان پلی کیستیک دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی با گرایش فیزیولوژی جانوری بوده و با کد اخلاق IR.BASU.REC.1398,036 به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا بابت کمک‌های مالی که در قالب گرنت پژوهشی

نقشی بسیار اساسی در این بافت‌ها داشته باشند (۲۱). سلیم اوغلو و همکاران در مطالعه‌ای در مورد موش‌های مبتلا به PCOS نشان دادند که استفاده مکملی از ویتامین D3 می‌تواند در تنظیم غلظت هورمونی و بهبود این سندرم نقش داشته باشد (۲۲). همسو با نتایج فوق، با استفاده از ویتامین D3 در پژوهش حاضر به نقش محافظتی این ویتامین در تنظیم هورمونی و بهبود سندرم تخمدان پلی کیستیک پی برده شد. بیشتر مطالعات موجود نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم آروماتاز موجب تحریک سلول‌های گرانولوزا می‌شود تا از این طریق، آندروژن‌ها را به استروژن تبدیل کند و در نتیجه، تعادل بین آندروژن‌ها و استروژن‌ها ایجاد شود. در مقابل، مهار فعالیت آروماتاز در سلول‌های گرانولوزا، تبدیل تستوسترون به استروژن را سرکوب نموده و غلظت استرادیول را کاهش می‌دهد و منجر به آنولاسیون (عدم تخمک‌گذاری) می‌شود. از سوی دیگر در پژوهشی که توسط میرازی و همکاران صورت گرفت، نشان داده شد که عصاره میوه عناب به دلیل داشتن ویتامین‌های A، E، C و کاروتنوئیدها و مواد معدنی خاص مانند روی و سلنیوم، با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد در روند کاهش التهاب و اختلالات تخمدانی موجب بهبود شرایط PCOS می‌شود (۲۳). در برخی از مطالعات مشخص شده است که در سندرم PCOS، افزایش هورمون تستوسترون در خون موش‌های مورد بررسی مشاهده می‌شود. علت این پدیده، تغییرات ایجاد شده در محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی بیان شده است (۲۴). عصاره گیاه پنج انگشت به طور مفیدی اختلالات فاز لوتینی را برطرف می‌سازد. اکثر این اختلالات به دلیل ناکافی بودن ترشح پروژسترون به وجود می‌آیند. به نظر می‌رسد که گیاه پنج انگشت با اثر بر محور هیپوفیز-هیپوتالاموس و تنظیم ترشح گنادوتروپین‌ها باعث متعادل شدن ترشح هورمون‌های تخمدان به ویژه پروژسترون شده و منجر به ایجاد نظم در سیکل جنسی می‌گردد (۲۵). علاوه بر این، استفاده از این گیاه باعث کاهش وزن و حجم تخمدان می‌شود. این گیاه با اثر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز موجب کاهش ترشح تستوسترون شده و در نهایت باعث کاهش وزن تخمدان می‌شود (۲۶). استفاده از عصاره گیاه به لیمو و ویتامین D3 و نیز استفاده توأم از آن‌ها در موش‌های مبتلا به PCOS، کاهش معنادار ترشح هورمون تستوسترون در موش‌های

صورت پذیرفت، تشکر و قدردانی نمایند.

References:

1. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol* 2014;6:1-13. [PMID: 24379699](#)
2. Hudecova M, Holte J, Olovsson M, Larsson A, Berne C, Poromaa IS. Diabetes and impaired glucose tolerance in patients with polycystic ovary syndrome-a long term follow-up. *Hum Reprod* 2011;26(6):1462-8. [PMID: 21427116](#)
3. Gambineri A, Patton L, Altieri P, Pagotto U, Pizzi C, Manzoli L, et al. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes* 2012;61(9):2369-74. [PMID: 22698921](#)
4. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(4):219-31. [PMID: 21263450](#)
5. Daniilidis A, Dinas K. Long term health consequences of polycystic ovarian syndrome: a review analysis. *Hippokratia* 2009;13(2):90-2. [PMID: 19561777](#)
6. Shi Y, Cui Y, Sun X, Ma G, Ma Z, Gao Q, et al. Hypertension in women with polycystic ovary syndrome: prevalence and associated cardiovascular risk factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;173:66-70. [PMID: 24368020](#)
7. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2009;19(3):398-405. [PMID: 19778486](#)
8. Haoula Z, Salman M, Atiomo W. Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2012;27(5):1327-31. [PMID: 22367984](#)
9. Amin B, Noorani R, Razavi BM, Hosseinzadeh H. The effect of ethanolic extract of *Lippia citriodora* on rats with chronic constriction injury of neuropathic pain. *Cell J* 2018;19(4): 528-36. [PMID: 29105386](#)
10. Lin MW, Wu MH. The role of vitamin D in polycystic ovary syndrome. *Indian J Med Res* 2015;142(3):238-40. [PMID: 26458338](#)
11. Alvarez JA, Ashraf AP, Hunter GR, Gower BA. Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone are independent determinants of whole-body insulin sensitivity in women and may contribute to lower insulin sensitivity in African Americans. *Am J Clin Nutr* 2010;92(6):1344-9. [PMID: 20861177](#)
12. Behmanesh N, Abedelahi A, Nozad Charoudeh H, Alireza Alihemmati A. Effects of vitamin D supplementation on follicular development, gonadotropins and sex hormone concentrations, and insulin resistance in induced polycystic ovary syndrome. *Turk J Obstet Gynecol* 2019;16(3):143-50. [PMID: 31673465](#)
13. Lee KM, Hwang MK, Lee DE, Lee KW, Lee HJ. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *J Agric Food Chem* 2010;58(9):5815-20. [PMID: 20377179](#)
14. Geraets L, Moonen HJ, Brauers K, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. Dietary flavones and flavonols are inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr* 2007;137(10):2190-5. [PMID: 17884996](#)
15. Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha KC, Chawda R, Nair H, et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1593(1):29-36. [PMID: 12431781](#)
16. Sadoughi S. Effects of crocin on ovarian follicle and serum sex hormone in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rat model. *J Ardabil Univ Med Sci* 2017;17(2):198-210. [Link](#)
17. Ghafurniyani H, Azarnia M, Nabiuni M, Karimzadeh L. The effect of green tea extract on reproductive improvement in estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome in rat. *Iran J Pharm Res* 2015;14(4):1215-33. [PMID: 26664389](#)
18. Espinoza JA, Alvarado W, Venegas B, Roberto Domínguez R, Morales-Ledesma L. Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod*



Biol Endocrinol 2018;16(1):86. [PMID: 30193590](#)

19. Leyva-Jiménez FJ, Lozano-Sánchez J, Cádiz-Gurrea M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. Functional Ingredients based on Nutritional Phenolics. A case study against inflammation: Lippia genus. *Nutrients* 2019;11(7):1646. [PMID: 31323877](#)
20. Hyppönen E, Power C. Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr* 2007;85:860-8. [PMID: 17344510](#)
21. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol* 2012;166(5):765-78. [PMID: 22275473](#)
22. Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, Ersoy C, Guclu M, Ozkaya G, et al. The effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2010;33(4):234-8. [PMID: 19820295](#)
23. Mirazi N, Shamekhi Rajabpoor S, Izadi Z. Effect of hydroethanolic extract of Jujube Fruit (*Zizyphus jujube* L.) in rat with polycystic ovary syndrome. *Armaghane Danesh* 2020;24(5):746-62. [Link](#)
24. Cádiz-Gurrea ML, Alañón-Pardo E, Arráez-Román D, Fernández-Arroyo S, Micol-Molina V, Roche E. Bioactive compounds from *Lippia citriodora*: application in diseases prevention. Occurrences, structure, biosynthesis, and health benefits based on their evidences of medicinal phytochemicals in vegetables and fruits. New York: Nova Science Publisher; 2017. [Link](#)
25. Russo M, Galletti GC. Medicinal properties and chemical composition of *vitexagnus-castus* L. a review. *Int Symposium Med Aromatic Plants* 1996;426:105-12. [Link](#)
26. Jelodar GH, Karami E. Effect of hydroalcoholic extract of *vitex agnus-castus* fruit on ovarian histology in rat with induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *J Babol Univ Med Sci* 2013;15(3):96-102. [Link](#)
27. Babaei Abrak S, Zhiani R. Investigation of chemical composition of *Lippia citriodora*: essential oil of *Lippia citriodora* promote survival of PC12 cells following treatment with H₂O₂. *Neurosci J Shafaye Khatam* 2014;2(1):31-9. [Link](#)
28. Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Vamvakias M, Bardouki H, Galanis A, et al. Chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *Lippia citriodora*. *Molecules* 2018;23(1):123. [PMID: 29329229](#)
29. Skaltsa H, Shammass G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Med* 1988;54(5):465. [PMID: 17265320](#)
30. Sammar M, Abu-Farich B, Rayan I, Falah M, Rayan A. Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: *In vitro* evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncol Lett* 2019;18(6):6563-71. [PMID: 31819777](#)
31. Eidi M, Kavvani AI, Shahabzadeh S, Sasaninezhad Z, Ghahramani R, Nomani MH. Effect of *Lippia Citriodora* on anxiety behaviour in adult male rats. *Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv* 2014;36(5):68-73. [Link](#)

