

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش سوری

فاضله مشفق^۱، سعیده ظفر بالانژاد^{۱*}، خدیجه شاهرخ‌آبادی^۱، آرمین عطاران‌زاده^۲

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

۲. گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی، مشهد، ایران

پذیرش: ۱۶ تیر ۱۴۰۰

دریافت: ۳۰ خرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف: سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در زنان است. گلبرگ زعفران حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات گلیکوزیدی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. در این تحقیق اثرات عصاره گلبرگ زعفران بر PCOS در موش سوری مورد مطالعه قرار گرفت. **روش‌ها:** موش‌ها به گروه‌های کنترل، شم، PCOS و تجربی تقسیم شدند. به گروه PCOS و تجربی تستوسترون انانتات (۱ میلی‌گرم) تزریق شد. پس از ۴ هفته، گروه تجربی در دوزهای ۵۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز تحت درمان با عصاره گلبرگ زعفران قرار گرفتند. نمونه‌های تخمدان و خون برای بررسی بافت‌شناسی و سرولوژی جمع‌آوری شد. علاوه بر این بیان ژن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که عصاره گلبرگ در موش‌های PCOS باعث کاهش هورمون‌های لوتئینه‌کننده ($p < 0/05$ ، $p < 0/01$)، استروژن ($p < 0/05$ ، $p < 0/01$ ، $p < 0/001$) و تستوسترون ($p < 0/05$ ، $p < 0/001$)، افزایش هورمون‌های محرکه فولیکولی ($p < 0/05$ ، $p < 0/01$) و پروژسترون ($p < 0/05$ ، $p < 0/01$) شد، بیان ژن‌های التهابی راکاهش و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در سرم افزایش داد ($p < 0/001$). **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره گلبرگ زعفران با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش بیان ژن‌های التهابی و بازگرداندن مکانیسم بازخورد استروژنی در سیستم هیپوفیز-تخمدان، PCOS را در موش‌ها بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، گلبرگ زعفران، مارکرهای التهابی

مقدمه

چاقی، دیس لیپیدی و دیابت نوع ۲ مشخص می‌شود [۲]. تخمک‌گذاری در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به شدت ضعیف است، که بخشی از آن به دلیل افزایش ترشح هورمون لوتئینه‌کننده^۱، کمبود شیب LH و بلوغ مجدد فولیکول‌های نابالغ است [۳]. شواهد نشان می‌دهد که PCOS با یک بیماری التهابی سیستمیک با درجه پایین مرتبط است و اطلاعاتی جی‌آدامز^۲ و همکاران نشان می‌دهد که تولید سیتوکینازها در سلول‌های گرانولوزا فولیکول‌های تخمدان در

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک^۱ شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در زنان در سنین باروری است. عوامل ژنتیکی و محیطی متعددی مانند قرارگرفتن در معرض آندروژن‌ها، وضعیت تغذیه‌ای در رحم، مقاومت به انسولین، تغییرات وزن بدن و همچنین قومیت در بروز PCOS دخالت دارند [۱]. مورفولوژی تخمدان پلی‌کیستیک عمدتاً با هایپر آندروژنیسم، اختلال در تخمک‌گذاری و تظاهرات کلینیکی عمده از جمله اختلالات قاعدگی، ناباروری و سندرم‌های متابولیکی مانند

² Luteinizing hormone (LH)

³ Adams J

¹ Polycystic ovary syndrome (PCOS)

زعفران است ولی در حال حاضر به عنوان ماده زائد دور ریخته می‌شوند [۱۲]. گلبرگ‌های زعفران حاوی پروتئین، چربی، فیبر، سدیم، پتاسیم، کلسیم، مس، آهن، منیزیم، روی و فسفر هستند [۱۳]. همچنین از فلاوانول‌ها (کامفورول)، آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فنلی، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها تشکیل شده است [۱۳]. مطالعات دارویی مدرن نشان داده است که عصاره گلبرگ زعفران دارای اثرات ضدتوموری، آنتی‌اکسیدانی، ضد درد، ضدالتهاب و ضدافسردگی است [۱۴].

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر بافت تخمدان مدل القا شده سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های NMRI انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره

در این تحقیق از گلبرگ‌های گیاه زعفران، جمع‌آوری شده از زمین‌های کشاورزی شهرستان گناباد واقع در خراسان رضوی استفاده شد. گیاه زعفران توسط هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد مورد تایید واقع گرفت و به آن کد (IAUM: ۱۰۳۳۸) داده شد. گلبرگ‌ها، در شرایط استاندارد، دور از نور خورشید، رطوبت، آلودگی میکروبی با تهویه مناسب و در سایه خشک شدند. جهت عصاره‌گیری، گلبرگ‌های خشک‌شده گیاه زعفران توسط آسیاب برقی پودر گردید. برای استخراج عصاره گلبرگ زعفران توسط دستگاه سوکسوله، از دو حلال اتانول و آب به نسبت ۷۰:۳۰ استفاده شد. حلال آن با استفاده از دستگاه روتاری تنظیم شده در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد با دور متوسط خارج گردید. حدود ۲ گرم عصاره از مجموع ۳۰ گرم پودر گلبرگ زعفران به دست آمد.

حیوانات و گروه‌های مورد آزمایش

این مطالعه بر روی ۷۲ سر موش سوری ماده بالغ، نژاد NMRI (با میانگین وزن ۲۵-۳۵ گرم) انجام گرفت. اقدامات و آزمایشات مراقبت از حیوانات به دنبال رهنمودهای تعیین شده توسط کمیته اخلاق و مراقبت از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد (خراسان رضوی، ایران؛ تأییدشده با شماره (IR.IAU.MSHD.REC.1398.203). حیوانات از خانه

زنان مبتلا به PCOS به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است [۳]. فاکتور نکروز تومور آلفا^۴ و اینترلوکین ۶^۵ سیتوکین‌های التهابی هستند که سلول‌های تکا فولیکولی را تحریک و تکثیر می‌کنند و همچنین نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های طبیعی تخمدان در طول رشد دارند [۴]. در بیماران مبتلا به PCOS، سطح IL-6، TNF- α و پروتئین فعال C^۶ و همچنین تعداد گلبول‌های سفید خون و تعداد نوتروفیل‌ها نسبت به شاخص توده بدنی^۷ بیشتر است [۵]. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش IL-6 ممکن است مربوط به هیپراندرژیسم و مقاومت به انسولین در بیماران PCOS باشد [۶].

طبق مطالعات اخیر، استرس اکسیداتیو نیز نقش مهمی در ایجاد علائم سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مانند افزایش تولید آندروژن و ناباروری دارد [۷]. تعادل در گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر^۸ در چندین فرآیند سیستم تولید مثل زنان، از جمله بلوغ تخمک، تخمک‌گذاری و لقاح نقش فیزیولوژیکی مهمی دارد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند که مکانیسم‌های محافظتی در برابر اثرات استرس اکسیداتیو دارند و به تولید متعادل ROS توسط سلول‌های بدن کمک می‌کنند [۷]. بسیاری از مطالعات نشان داده است که این آنزیم‌ها در بیماران مبتلا به PCOS غیرطبیعی است [۷].

روش‌های مختلف مانند تغییر سبک زندگی، جراحی و داروهای مانند کلومیفن سیترات، متفورمین، لتروزول و تاموکسیفن برای درمان PCOS پیشنهاد شده است [۸]. با توجه به عوارض جانبی این داروها، تهیه داروهای جایگزین مانند استفاده از گیاهان و مشتقات آن‌ها به دلیل سمیت کم، هزینه پایین و سودمندی بیشتر از سایر روش‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۹].

Crocus sativus L. یک گیاه بی‌ریشه از خانواده Iridaceae است [۱۰]. تنها قسمت قابل‌استفاده در گیاه کلاله است و سایر قسمت‌ها مورد استفاده قرار نمی‌گیرند [۱۱]. گلبرگ‌ها که از نظر وزنی قسمت عمده گیاه زعفران را تشکیل می‌دهند، اگرچه خصوصیات شیمیایی آن‌ها شبیه کلاله‌های

⁴ Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

⁵ Interleukin 6 (IL-6)

⁶ C-reactive protein (CRP)

⁷ Body mass index (BMI)

⁸ Reactive oxygen species (ROS)

تستوسترون انانتات با توجه به تقسیم‌بندی گروه‌ها به صورت زیر پوستی در ناحیه پشت گردن به مدت چهار هفته و در سیکل استروس انجام شد [۱۵].

خونگیری، سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی سرم موش‌ها

در پایان دوره، موش‌ها با استفاده از کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، شرکت آلفاسان هلند) و زایلازین (۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، شرکت آلفاسان هلند) بیهوش شدند و ۵-۳ میلی‌لیتر خون از قلب آن‌ها کشیده شد. سرم خون‌ها جدا شده و غلظت سرمی هورمون‌های پروژسترون، استروژن، تستوسترون، لوتئینه‌کننده، محرکه فولیکولی^۹، و سطح فعالیت آنزیم‌های گلوکوتائون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به روش الیزا اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری از کیت‌های ساخت شرکت مونوباند^{۱۰} (آمریکا) استفاده شد.

بیان ژن

کل RNA با استفاده از کیت بافت خالص آماده RNA متعلق به شرکت نوروزن بایوتک^{۱۱} (کانادا) و بر اساس پروتکل کیت از تخمدان استخراج شد. نمونه‌های RNA بلافاصله توسط کیت سنتز cDNA از شرکت پارس توس (ایران) مورد استفاده قرار گرفت. از ژن گلیسرالدهید-۳-فسفات دی‌هیدروژناز^{۱۲} به عنوان ژن Housekeeping استفاده شد. با استفاده از کیت سایبر گرین^{۱۳} از شرکت امپلیکون^{۱۴} (آمریکا) و با دستگاه Real-Time PCR از کمپانی بایورد^{۱۵} (آمریکا) میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌ها بررسی گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) با هم مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین‌ها

حیوانات دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شده و در اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد مشهد در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موش‌های مورد مطالعه قبل از تجویز دارو به مدت حداقل ۷ روز در شرایط فوق نگهداری شدند، تا به شرایط محیط کاملاً عادت نمایند. طی این مدت حیوانات از غذای معمولی و آب کافی بهره‌مند بودند. سیکل جنسی همه موش‌ها با تهیه اسمیر واژنی طی ۱۴ روز تعیین شد و ۷۲ موش که سیکل منظم داشتند انتخاب شده و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند. (۱) گروه کنترل (۱۲ موش): موش‌های این گروه تحت هیچ تیماری قرار نداشتند. (۲) گروه شم (۱۲ موش): حیوانات این گروه مقدار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم روغن کنجد به عنوان حلال تستوسترون انانتات دریافت کردند. (۳) گروه PCOS (۱۲ موش): در این گروه موش‌ها به مدت ۴ هفته تستوسترون انانتات (شرکت داروسازی ابوریحان، ایران) به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن دریافت کردند. (۴) گروه تجربی (۳۶ موش): موش‌های این گروه مانند گروه سوم مدت ۴ هفته تستوسترون انانتات دریافت نموده و پس از تعیین سیکل جنسی و وزن بدن به منظور درمان به مدت ۱۵ روز عصاره گیاه را با دوزهای ۵۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند [۱۴] و در پایان نیز مجدداً سیکل جنسی و وزن آن‌ها ارزیابی شد.

تعیین سیکل جنسی

حیوانات در ابتدای کار و همچنین قبل از انجام خونگیری به مدت ۱۴ روز از نظر نظم مراحل سیکل جنسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این کار از طریق نمونه‌گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول‌های موجود در زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت. در موش سوری آزمایشگاهی طول دوره استروس ۴ یا ۵ روز بوده و دارای چهار مرحله اصلی است: (۱) پرو استروس، (۲) استروس، (۳) مت استروس، (۴) دی استروس [۱۵].

القاء سندرم تخمدان پلی‌کیستیک

جهت القاء PCOS از تستوسترون انانتات (۱ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن) استفاده شد. تیمار موش‌ها با

⁹ Follicle-stimulating hormone (FSH)

¹⁰ Monobind Company

¹¹ Norogen Biotek Company

¹² Glyceraldehyde-3-dehydrogenase (GAPDH)

¹³ Syber green Kit

¹⁴ Amplicon Company

¹⁵ BioRad iQ5 Company

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن

نام ژن ها	توالی آغازگر رفت	توالی آغازگر برگشت
<i>IL-6</i>	GACTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG	TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCCTC
<i>TNF-α</i>	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCCGCTTGGTGGTTTGTCTACGAC
<i>IL1β</i>	ACATTGCCAACCTCATCATCG	TTGAGCAGGTCCTTGTCTCTTG
<i>IL-18</i>	CAGCCAACGAATCCCAGACC	AGATAGGGTCACAGCCAGTCC
<i>GAPDH</i>	CGACTTCAACAGCGACTCAC	CCCTGTTGCTGTAGCCGAATTC

(SEM) گزارش گردید. جهت بررسی نتایج ($p < 0.05$) به‌عنوان معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج سنجش سطح هورمون‌های جنسی

از آنجایی که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و شم وجود نداشت، تنها اطلاعات گروه کنترل نشان داده شده است. نتایج نشان داد میانگین سطح هورمون‌های استروژن، تستوسترون، LH، در گروه PCOS افزایش و میانگین سطح هورمون‌های پروژسترون و FSH در این گروه نسبت به گروه

کنترل کاهش یافت ($p < 0.001$). در مقایسه با گروه PCOS، تزریق عصاره با غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های PCOS باعث کاهش در سطح هورمون‌های استروژن ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$)، تستوسترون ($p < 0.05$ ، $p < 0.001$)، و LH ($p < 0.05$)، FSH ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$)، افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). میانگین سطح این هورمون‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0.05$).

جدول ۲- مقایسه و بررسی اثرات عصاره گلبرگ زعفران بر تغییرات هورمون‌های جنسی در موش‌های مبتلا به بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.

گروه‌ها	استروژن (بیکوگرم بر میلی‌لیتر)	پروژسترون (بیکوگرم بر میلی‌لیتر)	هورمون لو‌تئینه‌کننده (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	هورمون محرکه فولیکولی (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	تستوسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
کنترل	۱/۱۶±۴۱/۸۳	۳/۵۴±۳۶/۸۳	۰/۱۲±۰/۷۳	۰/۸۱±۵/۶۶	۰/۸۱±۳/۳۳
PCOS	۱/۱۶±۴۱/۸۳	۳/۰۶±۱۵/۸۳	۰/۸۹±۳/۳	۰/۷۵±۲/۸۳	۰/۵۱±۵/۶۶
تجربی ۵۰ mg/kg	*۱/۱۶±۵۹/۸۳	*۲/۰۶±۲۰/۳۳	*۰/۸۱±۱/۶۶	*۰/۷۵±۴/۱۶	*۰/۵۴±۴/۵
تجربی ۲۰۰ mg/kg	**۱/۰۴±۵۹/۵	*۱/۸۷±۲۰/۵	**۰/۵۴±۱/۵	*۰/۵۱±۴/۳۳	***۰/۷۵±۳/۸۳
تجربی ۶۰۰ mg/kg	***۰/۸۹±۵۸/۶۶	**۱/۸۷±۲۱/۵	**۰/۵۶±۱/۴۸	**۰/۸۱±۴/۶۶	***۰/۵۴±۳/۵

اختلاف معنی‌دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه PCOS. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند. تعداد نمونه ۱۲ موش در هر گروه می‌باشد. PCOS: بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.

نتایج سنجش سطح سرمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج بررسی سطح سرمی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در مدل موش PCOS نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در موش‌های گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0/001$). با این حال، مصرف عصاره گلبرگ زعفران در گروه تجربی با دوزهای ۵۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به افزایش قابل توجهی در سطح آنزیم‌های کاتالاز ($p < 0/001$ ، $p < 0/05$)، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز ($p < 0/01$) شد (جدول ۳). میانگین سطح سرمی این آنزیم‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0/05$).

نتایج سنجش بیان ژن‌های التهابی

همانطور که نمودارهای ۴-۱ نشان داده شده، در موش‌های گروه PCOS، میزان بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $IL-18$ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/001$). در حالی که تزریق عصاره گلبرگ زعفران به موش‌های گروه تجربی (۵۰، ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) میزان بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $IL-1\beta$ ($p < 0/001$) و $IL-18$ ($p < 0/001$ ، $p < 0/05$) را کاهش داد. میزان بیان این ژن‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0/05$).

بحث

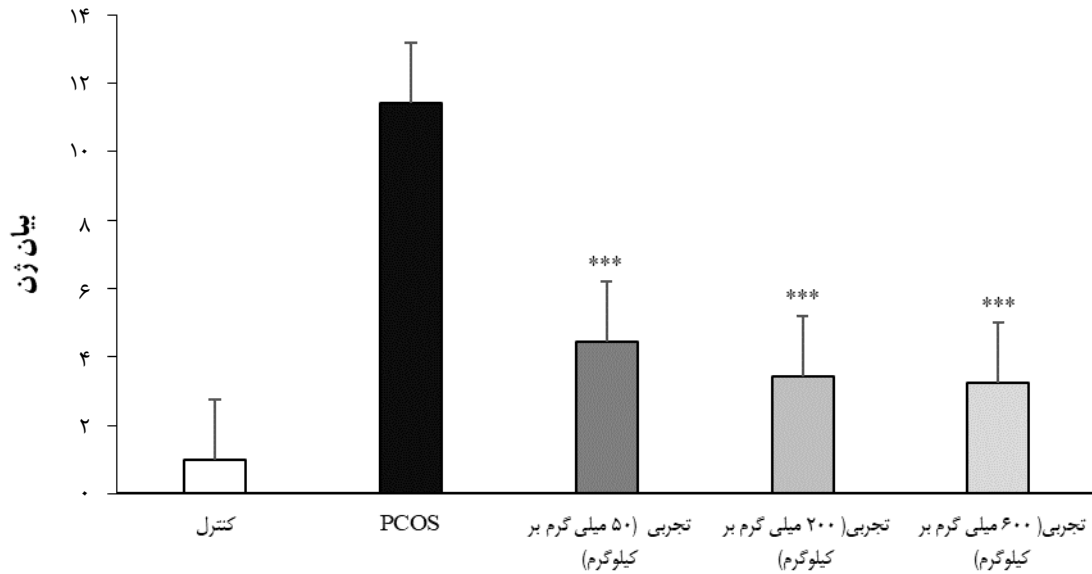
در تحقیق حاضر، برای اولین بار، اثر درمانی عصاره گلبرگ زعفران، در یک مدل حیوانی PCOS القا شده توسط تستوسترون انانتات، بررسی شد. گلبرگ زعفران به عنوان یک محصول جانبی در سطح بالایی تولید می‌شود اما پس از برداشت دور ریخته می‌شود [۱۳]. با این حال، گلبرگ زعفران می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی مناسب برای PCOS در مقایسه با داروهای قبلی در نظر گرفته شود زیرا ارزاتر از سایر گیاهان دارویی و دارای متابولیت‌های ثانویه با خواص دارویی بالا و سمیت کم است. در بسیاری از مطالعات، استفاده از گیاهان به عنوان داروی جایگزین برای PCOS گزارش شده است که از بروز عدم تعادل هورمونی جلوگیری کرده و علائم PCOS را در موش‌ها بهبود می‌بخشد [۸]. برهمکنش متابولیت‌های ثانویه، از جمله ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها، که مسئول فعالیت بیولوژیکی گیاه هستند، باعث بهبود اختلال در عملکرد هورمون‌ها و تولید مثل می‌شوند [۱۶].

دوزهای مصرفی در این مطالعه با توجه به مطالعات انجام شده بر روی دوز کشنده (۶/۶۷ گرم بر کیلوگرم) گلبرگ زعفران انتخاب گردید [۱۴]. در مطالعه دیگری که بر روی اثرات سمیت عصاره گلبرگ زعفران در موش صورت گرفت مشخص گردید که مصرف این گیاه به میزان ۳/۶ گرم بر کیلوگرم به مدت دو هفته سبب آزار بافت کبد و

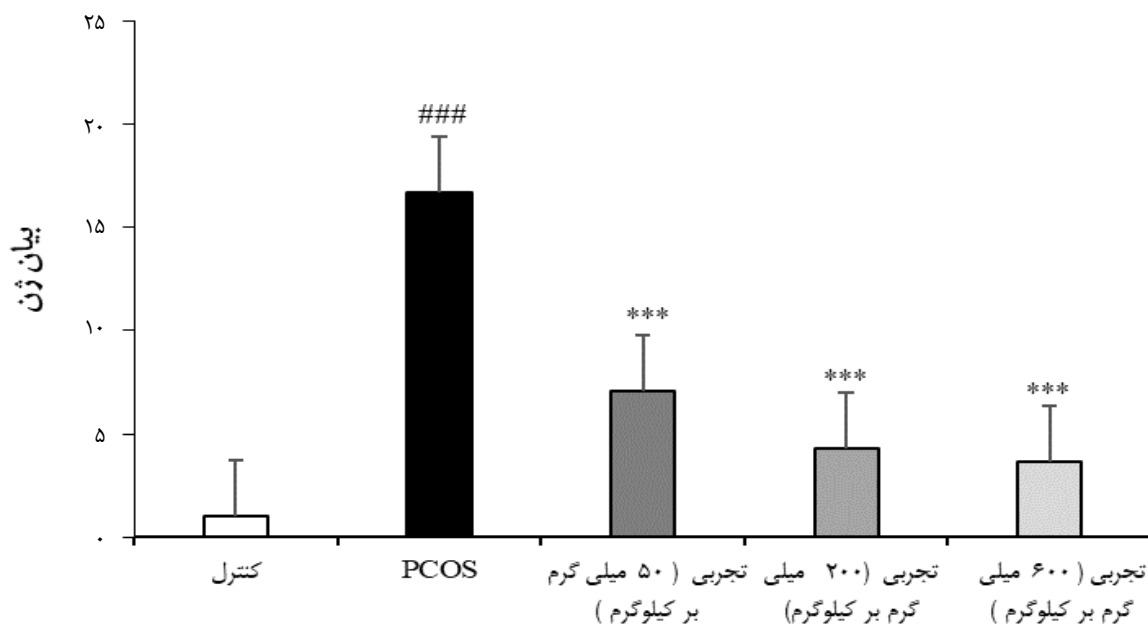
جدول ۳- مقایسه و بررسی اثرات عصاره گلبرگ زعفران بر تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های PCOS

گروه‌ها	کاتالاز (نانومول بر میلی لیتر)	سوپراکسید دیسموتاز (نانومول بر میلی لیتر)	گلوکاتایون پراکسیداز (نانومول بر میلی لیتر)
کنترل	۹۳/۶۶ ± ۱/۹۶	۲/۳۴ ± ۰/۲۲	۳۴/۶۶ ± ۰/۵۸
PCOS	۵۵/۵ ± ۳/۱۴	۰/۹۸ ± ۰/۰۰۹	۱۹/۲۰ ± ۰/۰۰۰۰۰۰۳۷
تجربی ۵۰ mg/kg	۵۹/۱ ± ۸۳/۷۲*	۱/۵۴ ± ۰/۳۷**	۲۰/۵۸ ± ۰/۶۶**
تجربی ۲۰۰ mg/kg	۶۴/۳۳ ± ۱/۲۱***	۲/۳۸ ± ۰/۲۰***	۳۴/۲۹ ± ۰/۴۴***
تجربی ۶۰۰ mg/kg	۷۳/۵ ± ۳/۱۴***	۲/۴۰ ± ۰/۲۸***	۳۴/۹۶ ± ۰/۹۰***

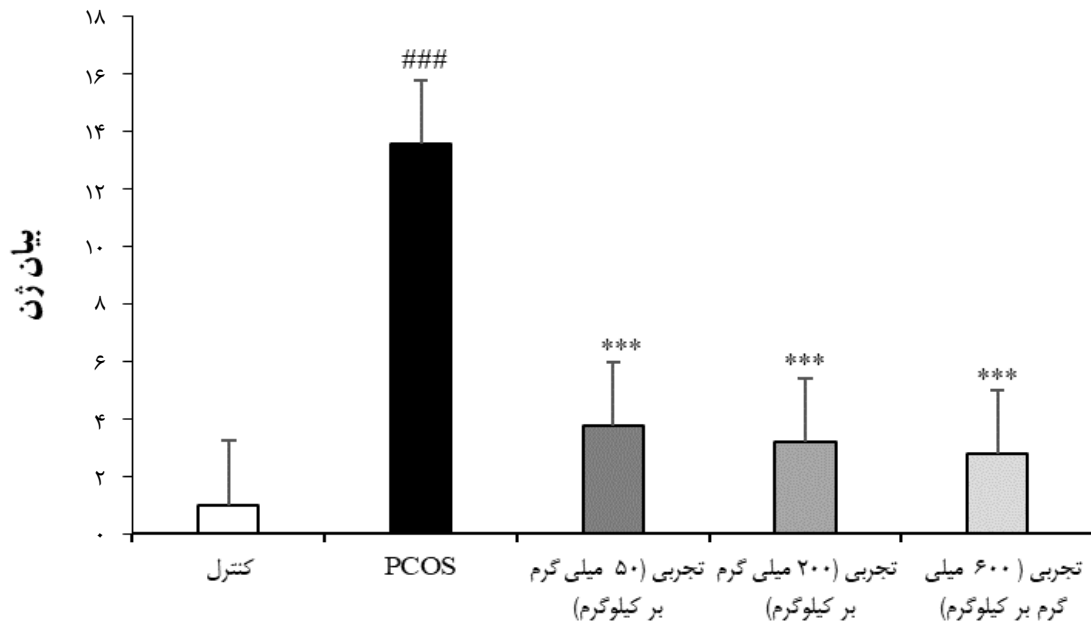
اختلاف معنی‌دار با $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با $p < 0/05$ ، ** $p < 0/01$ ، *** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه PCOS. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند. تعداد نمونه ۱۲ موش در هر گروه می‌باشد. PCOS: بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.



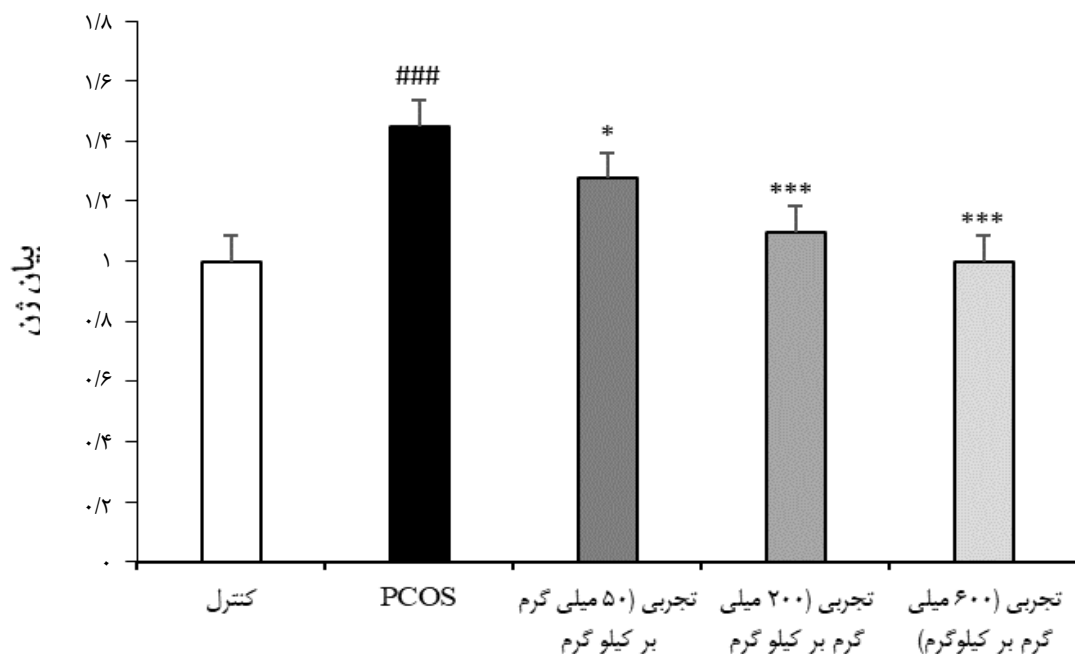
نمودار ۱- بیان ژن التهابی $TNF-\alpha$ در موش‌های تحت تیمار با عصاره گلبرگ زعفران: در همه گروه‌ها، کنترل با گروه PCOS و گروه‌های تجربی با گروه PCOS مقایسه شدند. ## اختلاف معنی‌دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه PCOS. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند. تعداد نمونه ۱۲ موش در هر گروه می‌باشد. بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.



نمودار ۲- بیان ژن التهابی $IL-6$ در موش‌های تحت تیمار با عصاره گلبرگ زعفران: در همه گروه‌ها، کنترل با گروه PCOS و گروه‌های تجربی با گروه PCOS مقایسه شدند. ### اختلاف معنی‌دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه PCOS. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند. تعداد نمونه ۱۲ موش در هر گروه می‌باشد. بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.



نمودار ۳- بیان ژن التهابی *IL-1β* در موش‌های تحت تیمار با عصاره گلبرگ زعفران: در همه گروه‌ها، کنترل با گروه PCOS و گروه‌های تجربی با گروه PCOS مقایسه شدند. #### اختلاف معنی‌دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل. * اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه PCOS. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار استاندارد از میانگین ارائه شده‌اند. تعداد نمونه ۱۲ موش در هر گروه می‌باشد. PCOS: بیماری پلی‌کیستیک تخمدان.



نمودار ۴- بیان ژن التهابی *IL-18* در موش‌های تحت تیمار با عصاره گلبرگ زعفران: در همه گروه‌ها، کنترل با گروه PCOS و گروه‌های تجربی با گروه PCOS مقایسه شدند. سطح اختلاف معناداری بین گروه PCOS ($n = 12$) با گروه کنترل ($n = 12$): $p < 0.001$ #### سطح اختلاف معناداری بین گروه تجربی ($n = 36$) با گروه PCOS $p < 0.05$ *، $p < 0.001$ *** داده‌ها براساس $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده است.

ریه گردید [۱۷]. درحالی، در مطالعه‌ای دیگر که بر روی آسیب کبدی القا شده توسط کربن تتراکلرید صورت گرفت تزریق عصاره این گیاه در دوزهای ۱، ۱/۱، و ۱/۲ گرم بر کیلوگرم باعث ترمیم آسیب کبدی شد [۱۸]. باتوجه به نتایج این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که مصرف عصاره گلبرگ زعفران در دوزهای استفاده شده در مطالعه حاضر اثرات سمیتی بسیار محدودی بر بروی بافت‌های دیگر بدن از جمله بافت کبد ایجاد می‌کند.

در این تحقیق جهت ایجاد تخمدان پلی‌کیستیک در مدل حیوانی از تستوسترون انانات استفاده شد و تغییرات هورمونی، التهای و آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان مهمترین علائم این سندرم موردتوجه قرار گرفت. تستوسترون انانات یک استروئید آنابولیک با خواص آندروژنی است که به‌عنوان یک القاکننده PCOS در نظر گرفته شده است [۱۵].

در مطالعه حاضر، پس از القا سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های PCOS مقادیر هورمون‌های پروژسترون و FSH کاهش ولی میزان هورمون‌های تستوسترون، استروژن و LH افزایش یافت. معمولاً در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک میزان هورمون پروژسترون کاهش و میزان هورمون‌های استرادیول، تستوسترون و LH افزایش می‌یابد [۱۹]. استفاده از عصاره گیاه گلبرگ زعفران در موش‌های PCOS سبب افزایش میزان FSH و کاهش میزان تستوسترون، استروژن و LH سرم شد. یافته‌های ما نیز نشان داد که عصاره گیاه گلبرگ زعفران میزان هورمون پروژسترون سرم را افزایش داده که این افزایش می‌تواند به‌دلیل انجام تخمک‌گذاری در موش‌های PCOS پس از دریافت عصاره باشد. همچنین مشخص گردید که استفاده از عصاره این گیاه می‌تواند میزان این هورمون‌ها را در موش‌های گروه تجربی تنظیم کرده و به حد کنترل برساند.

براساس تحقیقات انجام شده، سندرم پیش از قاعدگی به دلیل تغییر میزان استروژن و پروژسترون ایجاد می‌شود به‌طوری‌که میزان پروژسترون نسبت به استروژن کاهش می‌یابد و عصاره گلبرگ زعفران سبب تعادل طبیعی بین استروژن و پروژسترون در دوره قاعدگی می‌گردد. در حقیقت، گیاه گلبرگ زعفران با اثرات فیزیولوژیک-فارماکولوژیک خود سبب می‌شود که بدن کاهش یا افزایش هورمونی را متعادل کند [۲۰]. همچنین براساس گزارشات موجود، عصاره گلبرگ

زعفران محتوی تعدادی ترکیبات فیتواستروژنی است [۱۳]. استفاده درازمدت از عصاره‌های گیاهی که حاوی فیتواستروژن‌ها هستند می‌توانند با اثر فیدبک منفی بر LH میزان تستوسترون را کاهش دهند [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر نیز که توسط هیو^{۱۶} و همکاران وی بر روی اثرات کروسیتین به‌عنوان یکی از ترکیبات گلبرگ زعفران صورت گرفت، مشخص گردید که این ماده با تنظیم سطح هورمون‌های جنسی از طریق افزایش بیان کیسپتین در موش‌های مبتلا به PCOS، می‌تواند سبب بهبود این بیماری در موش‌ها گردد [۲].

مصرف عصاره گیاه گلبرگ زعفران در موش‌های PCOS همچنین سبب افزایش سطح سرمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتاتیون پراکسیداز شد، و مشخص گردید که استفاده از عصاره این گیاه می‌تواند سطح سرمی آنزیم‌ها را در گروه تجربی متعادل کرده و به حد کنترل برساند. بسکابادی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با مطالعه بر روی آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو القا در بافت تخمدان حیوانات نشان دادند استفاده از عصاره گلبرگ زعفران باعث افزایش سطح آنزیم‌های گلوکاتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد، که این اثرات به علت حضور ترکیبات موجود در این گیاه مانند: آنتوسیانین‌ها، کامپفرول، کروسیتین است [۲۲]. استرس اکسیداتیو یکی از مشخصه‌های اصلی PCOS است و تصور می‌شود که در پاتوژنز این سندروم نقش داشته باشد [۲۳].

همچنین نتایج حاصل از مطالعه و تحقیق زکا^{۱۷} و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی گلبرگ زعفران نشان داد که عصاره این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است، که این فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عمدتاً به‌حضور ترکیبات غنی از آنتی‌اکسیدان از جمله کامپفرول و کروسین در این گیاه نسبت داده می‌شود [۱۲]. احمدی و همکارانش در مطالعه‌ای با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گلبرگ زعفران بیان کرد که از این عصاره به علت خواص آنتی‌اکسیدانی بالای آن می‌توان در تولید داروهای مؤثر در درمان اختلالات تخمدان ناشی از حضور اکسیدان‌ها، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی استفاده کرد [۲۴]. به همین دلیل، گلبرگ‌های زعفران دارای پتانسیل تجاری به‌عنوان منبعی برای ترکیبات طبیعی با فعالیت

¹⁶ Hu¹⁷ Zeka

حیوان PCOS شود. همچنین مصرف گلبرگ زعفران می‌تواند باعث افزایش سطح سرمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن‌های التهابی در موش‌های مدل PCOS شود. بنابراین می‌توان از عصاره هیدروالکلی گلبرگ‌های زعفران به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب در بهبود علائم PCOS استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکترای می‌باشد. از اساتید گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر می‌گردد.

ملاحظات مالی

پژوهش حاضر هیچگونه حمایت مالی دریافت نکرده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ف.م: انجام مطالعه، جمع‌آوری و آنالیز داده‌ها، نگارش مقاله؛
س.ظ.ب: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش و اصلاح مقاله.
خ.ش: نظارت بر اجرای پژوهش و اصلاح مقاله؛ آ.ع: مشاوره و راهنمایی حین اجرای پژوهش.

فهرست منابع

- [1] Abbasian N, Momtaz S, Baeri M, Navaei-Nigjeh M, Hosseini R, Abdollahi M. Molecular and biochemical evidence on the role of zearalenone in rat polycystic ovary. *Toxicol* 154 (2018). 7-14.
- [2] Hu Q, Jin J, Zhou H, Yu D, Qian W, Zhong Y, Zhang J, Tanga C, Liu P, Zhou Y, Wang X, Sheng L. Crocetin attenuates DHT-induced polycystic ovary syndrome in mice via revising kisspeptin neurons. *Biomed. Pharmacother*. 107 (2018) 1363-1369.
- [3] Adams J, Liu Z, Athena Ren Y, Wun W, Zhou W, Kenigsberg S, Librach C, Valdes C, Gibbons W, Richards J. Enhanced inflammatory transcriptome in the granulosa cells of women with polycystic ovarian syndrome. *Clin Endocrinol Metab* 101 (2016) 3459-3468.
- [4] Mohammadi S, Karimzadeh Bardei L, Hojati V, Ghorbani A, Nabiuni M. Anti inflammatory effects of curcumin on insulin resistance index, levels of interleukin-6, c-reactive protein, and liver histology in polycystic ovary syndrome-induced rats. *Cell Journal* 19 (2017) 425-433.
- [5] Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh-Bardei L, Nabiuni M, The effect of curcumin on TNF- α , IL-6 and CRP expression in a model of polycystic ovary syndrome as an inflammation state. *J Reprod Infertil* 18 (2017) 352-360.
- [6] Ghowsi M, Khazali H, Sisakhtnezhad S, Evaluation of TNF- α and IL-6 mRNAs expressions in visceral and subcutaneous adipose tissues of polycystic ovarian rats and effects of resveratrol. *IJBM* 21 (2018) 165-174.
- [7] Montazeri H, Safavi M, Ebrahim-Habibi A, Yaghmaei P. The effects of betanin of beetroot in polycystic

آنتی‌اکسیدانی هستند که از عناصر فعال موجود در اجزا گیاه زعفران محسوب می‌شوند [۱۲].

در این مطالعه، همچنین نشان داده شد که تزریق عصاره گلبرگ زعفران به موش‌های PCOS باعث کاهش بیان ژن‌های التهابی $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $IL-18$ شد و توانست میزان بیان این ژن‌ها را در موش‌های تیمار شده با عصاره تنظیم کرده و به حد کنترل برساند.

مطالعات انجام شده بر روی گلبرگ زعفران نشان می‌دهد که در مدل‌های حیوانی کاهش سطح بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در بافت‌های بدن به علت حضور ترکیبات موجود در این عصاره گیاهی است که از طریق سرکوب التهاب از اختلالات بافت تخمدان و عوارض آن جلوگیری کند [۲۲]. حسین‌زاده و همکارانش (۲۰۰۲) با بررسی اثرات ضدالتهاب گلبرگ زعفران بر روی موش‌ها بیان کردند که عصاره گلبرگ زعفران اثر ضعیف تا متوسطی در برابر التهاب حاد دارد. و در التهاب مزمن نیز اثرات ضدالتهابی نشان دادند [۲۵]. یافته‌های ما نیز نشان داد که عصاره گیاه گلبرگ زعفران میزان بیان ژن‌های التهابی را کاهش می‌دهد این کاهش می‌تواند به دلیل مهار بیان ژن‌های التهابی در موش‌های PCOS پس از دریافت عصاره باشد.

نتیجه‌گیری

عصاره گیاه گلبرگ زعفران می‌تواند با ایجاد تغییر در ترشح هورمون‌های جنسی سبب بهبود وضعیت این هورمون‌ها در

- ovary syndrome induced rat. *J. Med. Plants* 17 (2018)1-9.
- [8] Jelodar G, Masoomi S, Rahmanifar F, Hydroalcoholic extract of flaxseed improves polycystic ovary syndrome in a rat model. *Iran J Basic Med Sci* 21 (2018) 645-650.
- [9] Darabia P, Khazalia H, Mehrabani Natanzi M, Therapeutic potentials of the natural plant flavonoid apigenin in polycystic ovary syndrome in rat model: via modulation of pro-inflammatory cytokines and antioxidant activity. *Gynecol Endocrinol* 20 (2019) 2-7.
- [10] Bagherzade G, Manzari Tavakoli M, Namaei M, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed* 7 (2016) 227-233.
- [11] Tavana S, Eimani H, Azarnia M, Shahverdi A, Eftekhari P, Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract on in vitro maturation, fertilization and embryo development of mouse oocytes. *Cell J13* (2012) 259-264.
- [12] Zeka K, Ruparella K, Continenza M, Stagos D, Vegliò F, Arroo R, Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia* 107 (2015) 128-134.
- [13] Hosseini A, Razavi M, Hosseinzadeh H, Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a Review. *Iran J Basic Med Sci* 21 (2018) 1091-1099.
- [14] Babaei A, Arshami J, Haghparast A, Danesh Mesgaran M, Effects of saffron (*Crocus sativus*) petal ethanolic extract on hematology, antibody response, and spleen histology in rats. *Avicenna J Phytomed* 4 (2014) 103-109.
- [15] Kalhori Z, Soleimani Mehranjani M, Azadbakht M, Shariatzadeh MA, Ovary stereological features and serum biochemical factors following induction of polycystic ovary syndrome with testosterone enanthate in mice: An experimental study. *Int J Reprod BioMed* 16 (2018) 267-274.
- [16] Hong Y, Yin Y, Tan Y, Hong K, Zhou H, The flavanone, naringenin, modifies antioxidant and steroidogenic enzyme activity in a rat model of letrozole-induced polycystic ovary syndrome. *Med Sci Monit* 25 (2019) 395-401.
- [17] Karimi Gh, Taiebi N, Hosseinzadeh H, Shirzad F. Evaluation of Subacute Toxicity of Aqueous Extract of *Crocus sativus* L. Stigma and Petal in Rats. *J. Med. Plants* 3 (2004) 29-35.
- [18] Iranshahi M, Khoshangosht M, Mohammadkhani Z, Karimi GH. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of saffron stigma and petal on liver toxicity induced by carbon tetrachloride in mice. *Pharmacol J* 1 (2011) 203-212.
- [19] Abbasian N, Momtaz S, Baeric M, Navaei-Nigjeh M, Hosseini R, Abdollahi M, Molecular and biochemical evidence on the role of zearalenone in rat polycystic ovary. *Toxicol* 154 (2018) 7-14.
- [20] Agha- Hosseini M, Kashani L, Aleyaseen A, Ghoreishi A, Rahmanpour H, Zarrinara A, *Crocus sativus* L.(saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo- controlled trial. *BJOG* 115 (2008) 515-519.
- [21] Shao Y, Chang Z, Cheng Y, Wang X, Zhang J, Feng X, Guo Y, Liu J, Hou R, Shaoyao-Gancao Decoction alleviated hyperandrogenism in a letrozole-induced rat model of polycystic ovary syndrome by inhibition of NF-κB activation. *Biosci Rep* 39 (2019) 1-14.
- [22] Boskabady M.H, Farkhondeh T, Antiinflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Crocus sativus* L. and its main constituents. *Phytother Res* 30 (2016) 1-23.
- [23] Masjedi F, Keshtgar S, Zal F, Talaei-Khozani T, Sameti S, Fallahi S, Kazeroni M, Effects of vitamin D on steroidogenesis, reactive oxygen species production, and enzymatic antioxidant defense in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Steroid Biochem Mol Biol* 18 (2019) 1-26.
- [24] Ahmadi Shadmehri A, Namvar F, Miri H, Yaghmaei P, Nakhaei Moghaddam M, Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activities of *Crocus sativus* petal extract. *RABMS* 5 (2019) 69-76.
- [25] Hosseinzadeh H, Younesi Hani M, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2 (2002) 1-8.

Research paper

Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of hydroalcoholic extract of saffron petals on polycystic ovary syndrome in mice

Fazeleh Moshfegh¹, Saeedeh Zafar Balanejad^{1*}, Khadige Shahrokhaby¹, Armin Attaranzadeh¹

1. Department of Biology, Islamic Azad University Mashhad Branch, Mashhad, Iran
2. Department of Pathology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 20 June 2021

Accepted: 7 July 2021

Abstract

Background and aims: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women. Saffron petals consist of, glycosides, flavonoids, and anthocyanins. In this study the effects of saffron petal extract (SPE) in PCOS-induced rats are evaluated.

Methods: mice were divided into control, sham, PCOS, and experimental groups. PCOS and experimental groups were injected with testosterone enanthate (1 mg). After 4 weeks, the experimental group was treated with SPE at doses of (50, 200, and 600) mg/kg for 14 days. Ovary and blood samples were collected for histological, serological analyses, in addition, the expression of genes was analyzed. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: Results showed that SPE The results showed that the petal extract in PCOS mice reduced luteinizing hormones ($p < 0.05$, $p < 0.01$), estrogen ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). And testosterone ($p < 0.05$, $p < 0.001$), increase in follicular stimulating hormones ($p < 0.05$, $p < 0.01$) and progesterone ($p < 0.05$, $p < 0.01$) Decreased the expression of inflammatory genes and increased antioxidant enzymes in serum ($p < 0.001$).

Conclusion: The present study provides in vivo evidence that saffron petal extract improved the PCOS in mice via increasing antioxidant factors, reducing inflammatory genes expression, and restoring the estrogenic feedback mechanism on the pituitary-ovary system.

Keywords: Antioxidant enzymes, Polycystic ovary Syndrome, Saffron petal, Inflammatory markers

Please cite this article as follows:

Moshfegh F, Zafar Balanejad S, Shahrokhaby K, Attaranzadeh A, Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of hydroalcoholic extract of saffron petals on polycystic ovary syndrome in mice. *Iran J Physiol Pharmacol* 4 (2020) 141-151.

*Corresponding author: mojgan_zafar@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-0388-9445)