

Research Paper

Immunomodulatory Effect of Fennel in Animal Model of Polycystic Ovarian Syndrome



Ensieh Seif Amirhoseiny¹, Ali Ganji^{1,2}, Ghasem Mosayebi^{1,2}, *Ali Ghazavi^{1,3,4}

1. Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Traditional and Complementary Medicine Research Center (TCMRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.



Citation: Seif Amirhoseiny E, Ganji A, Mosayebi Gh, Ghazavi A. [Immunomodulatory Effect of Fennel in Animal Model of Polycystic Ovarian Syndrome (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(1):22-33. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.1.51.4>

doi <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.1.51.4>



Article Info:

Received: 24 Dec 2019

Accepted: 05 Jan 2020

Available Online: 01 Apr 2020

Key words:

Foeniculum vulgare, FRAP, Nitric oxide, Polycystic ovary syndrome, Treg

ABSTRACT

Background and Aim Fennel with phytoestrogenic, antioxidant and anti-diabetic properties is used in traditional Iranian medicine to treat Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). Chronic inflammation is a new proposed mechanism in PCOS pathogenesis that suggests the role of immune system in this disease. Due to the main role of Treg cells in maintaining immune homeostasis, their impaired function, along with increased production of inflammatory compounds such as nitric oxide, can lead to persistent inflammation.

Methods & Materials In this experimental study, 18 BALB/c mice were randomly divided into three groups including control group, untreated PCOS-induced group, and fennel-treated group. The control group received 0.1 ml sesame oil for 21 days. PCOS was induced by subcutaneous injection of Dehydroepiandrosterone (60 mg/kg/day) plus 0.1 mL sesame oil for 21 days. Mice in third group were treated by intraperitoneal injection of 500 mg/kg/day fennel extract after 21 days. The regulatory of T cells (Tregs) were analyzed by flow cytometry method and nitric oxide level determination was performed by Griess Reaction method. Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) assay was used to measure the total antioxidant power.

Ethical Considerations This study was approved by the Ethical Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: IR.ARAKMU.REC.1397.312).

Results The estrous cycle was normalized after treatment with fennel. Fennel significantly reduced the number of ovarian cysts. Nitric oxide concentration decreased significantly while FRAP concentrations did not significantly alter. The number of Treg cells was also increased significantly.

Conclusion Due to the role of immune system in the incidence of inflammation, concurrent modulation of both immune and endocrine systems may open new horizons in the design of new therapeutic interventions for PCOS.

* Corresponding Author:

Ali Ghazavi, PhD.

Address: Department of Immunology & Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Tel: +98 (86) 34173502

E-mail: ghazaviali@arakmu.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine disorder [1]. The disease is heterogeneous and has various causes including immunological, hormonal and neurological factors [3]. Mild chronic inflammation is a new proposed mechanism in PCOS pathogenesis which indicates the role of the immune system. Given the side effects of classic medications, it is important to identify and introduce alternative therapies. Fennel, with its phytoestrogenic, antioxidant and anti-diabetic properties, is used in traditional Iranian medicine to treat PCOS. Due to the role of inflammation in PCOS immunopathogenesis and the anti-inflammatory effects of fennel [6], this study aimed to study the effect of fennel hydroalcoholic extract on serum antioxidant power, Nitric Oxide (NO) concentration and percentage of Treg cells in a rat model of PCOS.

Materials and Methods

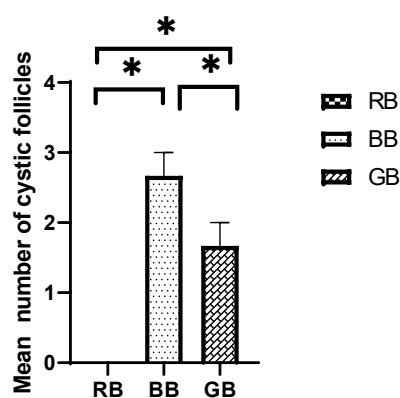
In this experimental study, 18 immature 21-day-old BALB / C mice weighing about 14 grams were used. The mice were divided into three groups of 6, including control group, untreated PCOS-induced group, and fennel-treated group. The control group received 0.1 ml of sesame oil subcutaneously for 21 days. The untreated and fennel-treated groups received 60 mg /kg Dehydroepiandrosterone (DHEA) plus 0.1 ml sesame oil subcutaneously for 21 days to induce PCOS [16]. After 21 days, the fennel-treated group received 0.5 ml of fennel extract (500 mg/kg, i.p.) for 21 days. Mice were weighed every 3 to 4 days with a scales and estrous

cycle for three periods during 42 days was determined by a vaginal smear. The serum sample was used to measure the NO concentration by Griess reaction method and the total antioxidant power was measured by the Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) assay. From the left ovary, 7 micron sections were prepared and stained with hematoxylin eosin. Splenocytes were separated from the spleen by perfusion and used to count Treg cells by flow cytometry analysis.

Results

The efficiency of the maceration method was 4.7%. The average weight in the study groups did not change significantly. At the start of DHEA injection in mice, estrous cycles were regular, but gradually the cycles became irregular. This irregularity is one of the signs of follicular cyst in the ovary. After treatment with fennel extract, the cycles became regular again. Fennel increased the number of antral follicles, but this increase was not significant. This plant significantly reduced ovarian cysts ($P=0.005$) (Figure 1). The number of corpus luteum in the PCOS group decreased significantly compared to the control group ($P=0.033$). Prescribing fennel increased the number of corpus luteum follicles, but this increase was not significant. The NO concentration in the untreated PCOS-induced group increased significantly compared to the control group ($P=0.001$).

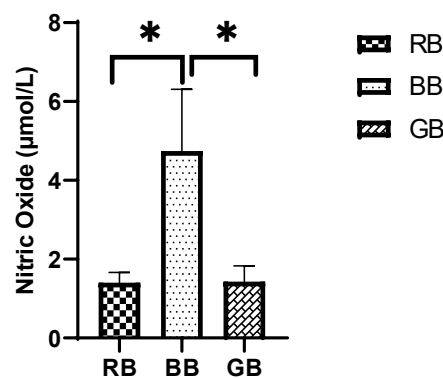
In the group treated with fennel extract, the NO concentration decreased significantly compared to the untreated group ($P=0.002$) (Figure 2). FRAP levels in the untreated PCOS-induced group decreased compared to the control group, but this decrease was not significant. FRAP levels in fennel-treated group increased compared to the untreated group, but this increase was not significant. The number of



 Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. Comparing the mean number of follicular cysts in the study groups

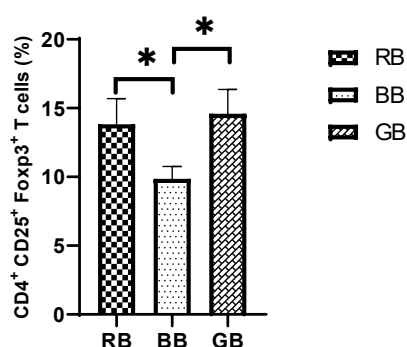
RB= control group; BB= untreated PCOS-induced group; GB= fennel-treated group; * significant ($p<0.05$)



 Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 2. Comparing the mean NO concentration in the study groups

RB= control group; BB= untreated PCOS-induced group; GB= fennel-treated group; * significant ($p<0.05$)



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 3. Comparing the mean number of Treg cells in the study groups

RB= control group; BB= untreated PCOS-induced group; GB= fennel-treated group; * significant ($P < 0.05$)

Treg cells in untreated PCOS mice decreased significantly compared to the control group ($P = 0.008$). Treatment with fennel extract significantly increased the number of Treg cells ($P = 0.003$) (Figure 3).

Discussion

Induction of PCOS in mice caused irregular estrous cycles, a significant increase in the number of cystic ovarian follicles, and a significant decrease in the number of corpus luteum follicles. These results indicate the successful induction of PCOS in the animal model of PCOS. Estrous cycles became normal after treatment with fennel extract, which indicates the effectiveness of fennel hydroalcoholic extract in reducing the symptoms of PCOS.

Fennel is a plant with anti-inflammatory, antioxidant and phytoestrogenic properties [10, 11]. Injecting fennel extract significantly reduced the number of cystic follicles. One of the important characteristics of this disease is a decrease in the rate of ovulation which causes a significant reduction in the number of corpus luteum follicles in polycystic ovaries [21]. Studies have shown that flavonoid compounds in plants with antioxidant activity can reduce oxidative stress in ovarian tissue and reduce the number of cystic follicles in this tissue [22].

The use of fennel extract significantly reduced NO level compared to the untreated group. Excessive NO production in the uterus can lead to inflammation and miscarriage [27]. Oxidative stress in patients with PCOS plays an important role in altering follicular structure and overgrowth of mesenchymal ovarian tissue [28].

The number of Treg cells in mice with PCOS decreased significantly compared to the control group, and the administration of fennel extract significantly increased the number of these cells. Some studies have shown that patients with PCOS have a lower Treg rate than healthy people that can lead to mild chronic inflammation, which is suggested as a new mechanism in PCOS pathogenesis and the role of immune system in this disease [29].

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: IR.ARAKMU.REC.1397.312).

Funding

This study was extracted from a research proposal (Code: 3175). It was financially supported by the Deputy for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences.

Authors' contributions

All authors met the writing standards based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research of Arak University of Medical Sciences for their support.

اثر ایمونومدولاسیون توری رازیانه در مدل حیوانی سندرم تخمدان پلی کیستیک

انسپه سیف امیرحسینی^۱، علی گنجی^{۱،۲}، قاسم مسیبی^{۲،۱}، علی قضاوی^{۱،۳،۴}

۱. گروه ایمنی شناسی و میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳. مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۴. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: رازیانه با خواص فیتواستروژنی، آنتی اکسیدانی و ضددیابتی در طب سنتی ایران برای درمان سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) به کار می رود. التهاب مزمن خفیف یک مکانیسم پیشنهادی جدید در پاتوژنز PCOS است که نقش سیستم ایمنی در این بیماری را مطرح می کند. با توجه به نقش کلیدی سلول های Treg در حفظ هموستاز ایمنی، اختلال در عملکرد این سلول ها به همراه افزایش تولید ترکیبات التهابی همچون نیتریک اکساید می تواند به بروز التهاب پایدار منجر شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ سر موش BALB/c به ۳ گروه تقسیم شدند. PCOS با تزریق زیرجلدی mg/kg/day DHEA ۶۰ در ۱ ml روغن کنجد به مدت ۲۱ روز القا شد. گروه کنترل منفی به مدت ۲۱ روز حلال (۱ ml روغن کنجد) دریافت کردند و گروه PCOS تحت درمان با تزریق داخل صفاقی 500 yad/gk/gm عصاره هیدروآلکلی رازیانه به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. سلول های Treg با فلوسایتومتری و غلظت نیتریک اکساید با روش گریس و قدرت آنتی اکسیدانی توتال با متد FRAP سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی: تمامی آزمایش های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اراک با شناسه مصوبه IR.ARAKMU.REC.1397.312 انجام گرفت.

یافته ها: سیکل جنسی در گروه های درمان شده با رازیانه طبیعی شد. این گیاه به طور معنی داری باعث کاهش کیست های تخمدانی شد. غلظت نیتریک اکساید به طور معنی داری کاهش پیدا کرد، ولی FRAP تغییر معنی داری نداشت. سلول های Treg نیز افزایش معنی دار داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نقش سیستم ایمنی در بروز التهاب، تعدیل پاسخ این سیستم همزمان با تعدیل پاسخ های سیستم اندوکراین می تواند افق جدیدی در طراحی مداخلات درمانی نوین برای بیماری PCOS باز نماید.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۰۳ دی ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۵ دی ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۳ فروردین ۱۳۹۹

کلیدواژه ها:

سندرم تخمدان پلی کیستیک، رازیانه، نیتریک اکساید، FRAP، Treg

مقدمه

می پردازد و میان پاسخ ایمنی مؤثر و واکنش های کنترل نشده تعادل برقرار می کند [۴]. یکی از سلول های اصلی تنظیمی لنفوسیت های Treg هستند که نقش مهمی در جلوگیری از التهاب دارند [۵]. مطالعات حاکی از این است که در بیماران مبتلا به PCOS میزان Treg کاهش یافته و در نتیجه باعث التهاب می شود [۶].

در این بیماران میزان انسولین افزایش می یابد که باعث افزایش هورمون های جنسی می شود. افزایش هورمون های جنسی باعث افزایش فعالیت رادیکال های آزاد مانند نیتریک اکساید و کاهش قدرت آنتی اکسیدانی توتال از طریق کاهش فعالیت آنتی اکسیدان هایی مانند کاتالاز^۲، سوپر اکسید

سندرم تخمدان پلی کیستیک^۱ یک اختلال غدد درون ریز است. تخمدان های پلی کیستیک، هیپرآندروژنیسم، سندرم متابولیک و مقاومت به انسولین از علائم این بیماری هستند [۱]. بیماران مبتلا به PCOS در معرض خطر ابتلا به سرطان اندومتر، ناباروری، چاقی، فشار خون بالا و دیابت هستند. شیوع این بیماری در زنان نابارور ۱۵ تا ۲۰ درصد است [۲]. این بیماری هتروژن بوده و علت های مختلفی از جمله عوامل ایمونولوژیک، عوامل هورمونی و عصبی در ایجاد آن نقش دارند [۳]. سیستم ایمنی به واسطه فراخوانی سلول ها و مولکول های تنظیمی، به مقابله با متغیرهای سلولی در بدن

2. CAT

1. (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome)

* نویسنده مسئول:

علی قضاوی

نشانی: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی و میکروبی شناسی.

تلفن: ۰۲ ۳۴۱۷۳۵۰۲ (۸۶) ۹۸+

پست الکترونیکی: ghazaviali@arakmu.ac.ir



مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

گیاه رازیانه از جهاد کشاورزی استان مرکزی تهیه شد. برای تهیه عصاره بعد از جمع‌آوری گیاه، آن را خشک و سپس پودر کرده و سپس عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون انجام شد؛ بدین صورت که ۱۹/۶ گرم پودر از این گیاه را به ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (مرک، آلمان) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خیس‌انده شد. محتویات ظرف در طول این مدت توسط مگنت به آرامی چرخانده شد. سپس عصاره به کمک سیستم خلاء و کاغذ واتمن ۰/۴۵ میکرومتر (واتمن، انگلیس)، فیلتر و با دستگاه Rotary evaporate (هایدولف، آلمان) غلیظ شد. عصاره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و پس از توزین و محاسبه میزان بازدهی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۳].

بررسی سمیت حاد

قبل از شروع پژوهش LD₅₀ (متوسط دوز کشنده) و ED₅₀ (متوسط دوز مؤثر) عصاره رازیانه بررسی و مشخص شد که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LD₅₀ و غلظت بین ۵۰۰-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم ED₅₀ است. به همین دلیل غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره رازیانه به عنوان غلظت درمانی انتخاب شد [۱۳].

طبق دستورالعمل OECD^{۱۱} برای سنجش سمیت حاد، به طور تصادفی در هر گروه ۵ سر موش سوری ماده با سن ۵ الی ۶ هفته قرار گرفت. موش‌ها ۵ روز قبل از آزمایش برای خو گرفتن به محیط، در قفس‌ها نگهداری و دقیقاً قبل از شروع آزمایش، وزن شدند. گروه کنترل تنها حلال (روغن کنجد) (باریج اسانس، ایران) را به صورت تزریق داخل صفاقی (i.p) دریافت کردند. گروه درمانی با رازیانه مقدار ۵۰۰ mg/kg عصاره رازیانه به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. حجم تزریقی برابر با ۱۰ mL/kg بود. موش‌ها ابتدا در ۶ ساعت اول پس از تزریق و سپس روزانه برای ۱۴ روز از نظر مرگ و میر، تغییرات وزن، الگوی رفتاری، ظاهر فیزیکی (پوست و خز)، تغییر در تنفس، آسیب، درد و علائم بیماری (لرزش، تشنج، اسهال و رخوت) پایش شدند. وزن موش‌ها در روز هفتم و چهاردهم نیز محاسبه شد [۱۴].

حیوانات و پروتکل آزمایش

در این مطالعه از ۱۸ سر موش BALB/C ماده نابالغ ۲۱ روزه با وزن حدود ۱۴ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه و در دمای تقریبی ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته و شرایط آب و غذایی یکسان نگهداری شدند. موش‌ها به ۳ گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل منفی، گروه کنترل

دیسموتاز^۳ و گلوکاتایون پراکسیداز^۴ شده و باعث استرس اکسیداتیو می‌شود [۷].

امروزه داروهای متعددی مانند متفورمین و کلومیفن سیترات برای درمان این بیماری استفاده می‌شود. متفورمین باعث افزایش حساسیت به انسولین می‌شود، میزان گلوکز خون را کاهش می‌دهد و از بروز استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. عوارض جانبی این دارو اسهال، حالت تهوع، ایجاد مشکلات کبدی و کلیوی است [۸]. کلومیفن سیترات نیز باعث القای تخمک‌گذاری در بیماران مبتلا به PCOS می‌شود، اما این دارو تنها در ۵۰ درصد بیماران تخمک‌گذاری را بهبود می‌بخشد و خطر ابتلا به سرطان اندومتر را در بیماران بالا می‌برد [۹]. با توجه به عوارض جانبی داروهای کلاسیک، شناسایی و معرفی درمان‌های جایگزین و مؤثر، اهمیت فراوانی دارد.

گیاهان دارویی به دلیل اثرات جانبی کمتر از چند دهه پیش به عنوان جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی مطرح شده‌اند و مصرف آن‌ها در جهان رو به افزایش است. یکی از گیاهان دارویی که در طب سنتی به اثرات مفید آن پی برده‌اند، رازیانه است. رازیانه گیاهی علفی و از خانواده Apiaceae است. نام علمی گیاه *Foeniculum Vulgare* است. قسمت دارویی مورد استفاده این گیاه، دانه است. دانه گیاه حاوی اسانس یا روغن فرار است و مهم‌ترین ترکیب اسانس ترانس آنتول^۵ است. ترکیبات دیگر اسانس شامل فنچون^۶، لیمونن^۷، متیل کایوکول^۸، آلفا پینن^۹ و آلفا فلندرین^{۱۰} است [۱۰]. رازیانه دارای خواص فیتو استروژنی [۱۱]، آنتی‌اکسیدانی [۱۰] و ضددیابتی است. در یک مطالعه، ترانس آنتول که جزء اصلی رازیانه است، باعث کاهش Th17 و افزایش Treg در موش‌های مبتلا به التهاب ناشی از LPS شد [۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر، رازیانه تولید TNF- α و ترشح MMP-9 را کاهش داد که خواص ضدالتهابی رازیانه را نشان می‌دهد [۱۰].

با توجه به نقش التهاب در ایمونوپاتوز PCOS و اثرات ضدالتهابی رازیانه، هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی رازیانه بر قدرت آنتی‌اکسیدانی سرم، میزان نیتریک اکساید (NO) و درصد سلول‌های Treg در مدل موشی سندرم تخمدان پلی کیستیک بود.

3. SOD
4. GPX
5. Trans anethole
6. Fenchone
7. Limonene
8. Methyl chavicol
9. Alpha pinene
10. Alpha phellandrene

11. Organization for Economic Co-operation and Development

سنجش نیتریک اکساید

این کار بر اساس روش گریس^{۱۲} انجام پذیرفت. مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. به طور خلاصه، سرم نمونه‌ها در حجم ۱۰۰ لاندا به میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. ۱۰۰ لاندا سولفانیل آمید ۱ درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد؛ سپس ۱۰۰ لاندا NED ۰/۱ درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الیزا خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد [۱۷].

آزمایش FRAP

مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. به طور خلاصه، معرف FRAP با مخلوط کردن ۱۰ لاندا بافر استات ۳۰۰ میکرو مولار، ۱ لاندا TPTZ ۱۰ میکرو مولار و ۱ لاندا محلول کلرید فریک ۲۰ میکرو مولار آماده شد. ۲۰۰ لاندا معرف FRAP را به ۱۰ لاندا از نمونه‌ها اضافه کرده و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد؛ سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه خوانشگر الیزا خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه گردید [۱۸].

شمارش Treg

برای شمارش Treg از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD4(PE)، CD25(PerCP)، FXP3(FITC) (BD) آمریکا استفاده شد. اسپلنوسیت‌های رنگ‌آمیزی شده توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCalibur™، آمریکا) ارزیابی شد. برای قابل قبول بودن قدرت آماری مطالعه در خصوص سلول‌های Treg که جمعیت کوچکی هستند، از هر گیت تعداد ۲۰ هزار سلول شمارش شد. داده‌ها توسط نرم افزار FlowJo آنالیز شد [۱۹].

آنالیز آماری

اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ تحلیل شد. برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی شفه (Scheffe's post-hoc test) استفاده شد. نتایج به صورت (Mean±SD) گزارش شد. $P < 0/05$ ، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بازدهی عصاره گیری

از ۱۹/۶ گرم پودر گیاه رازیانه در نهایت مقدار ۰/۹ گرم عصاره

مثبت و گروه درمانی با رازیانه تقسیم شدند. گروه کنترل منفی به مدت ۲۱ روز ۰/۱ میلی‌لیتر روغن کنجد (بارج اسانس، ایران) به صورت زیرجلدی (s.c) دریافت کردند. گروه‌های کنترل مثبت و درمانی با رازیانه به مدت ۲۱ روز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (DHEA Dehydroepiandrosterone) (سیگما، آمریکا) در ۰/۱ میلی‌لیتر روغن کنجد به صورت s.c برای القا PCOS دریافت کردند [۱۵].

بعد از ۲۱ روز گروه درمانی با رازیانه به مدت ۲۱ روز ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره رازیانه را به صورت i.p با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. وزن موش‌ها، هر ۳ تا ۴ روز یک بار با ترازو (متلر تولدو، سوئیس) و سیکل جنسی سه دوره در طول ۴۲ روز به وسیله اسمیر واژینال تعیین شد. بعد از ۴۲ روز حیوانات با کتامین (روتکس مدیکا، آلمان) به غلظت ۲۰ mg/kg و زایلازین (آلفاسان، هلند) با غلظت ۱۰۰ mg/kg بیهوش و سپس نخاعی شدند. خون‌گیری به وسیله سرنگ‌های هیپارینه از قلب انجام شد. خون‌ها بعد از یک ساعت به وسیله سانتریفیوژ (بکمن کالتر، آمریکا) سانتریفیوژ شدند و سرم نمونه‌ها بعد از جداسازی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای آزمایش NO و FRAP نگهداری شدند. تخمدان چپ جدا و در فرمالدئید ۱۰ درصد (سپیدان متین آسیا، ایران) به مدت ۷۲ ساعت برای بررسی هیستومورفولوژی تخمدان فیکس شد. اسپلنوسیت‌ها نیز از طریق پرفیوژ از طحال جدا شد و پس از لیز گلبول‌های قرمز برای شمارش سلول‌های Treg به کار رفت.

بررسی سیکل استروس (سیکل جنسی)

در سه دوره ۷ روزه (دوره اول، یک هفته پس از دریافت P، دوره دوم آخرین هفته دریافت P و دوره سوم، هفته آخر درمان با عصاره رازیانه) از موش‌ها اسمیر واژینال تهیه و با تریپان بلو (مرک، آلمان)، رنگ‌آمیزی شد و چهار فاز پرو استروس، استروس، دی استروس و مت استروس در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

هیستومورفولوژی تخمدان

ابتدا تخمدان چپ از حفره شکمی موش‌ها خارج و با محلول سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و سپس در فرمالدئید ۱۰ درصد (سپیدان متین آسیا، ایران) قرار گرفت. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی، مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری طی شد و مقاطع ۷ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی شد.

شمارش تعداد جسم زرد و دستجات فولیکول‌های سالم با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی $\times 40$ انجام شد و تعداد فولیکول‌های پری آنترال (دارای چندین لایه سلول گرانولوزا)، آنترال (دارای حفره) و کیستیک شمارش شد [۱۶].

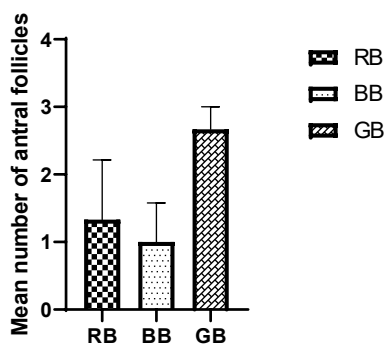


تصویر ۲. مقطع تخمدان گروه کنترل منفی (بزرگنمایی میکروسکوپی $40\times$). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین-CL: جسم زرد.

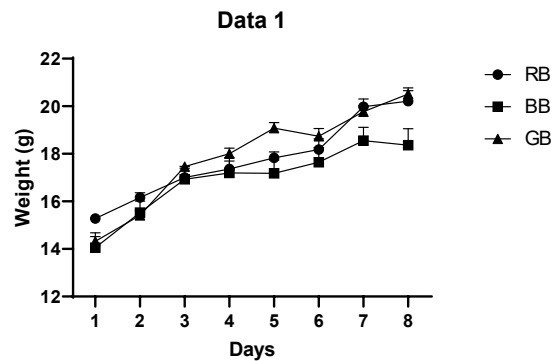
بررسی فازهای جنسی

در شروع تزریق P به موش‌ها، سیکل‌های جنسی منظم بود، ولی به تدریج نامنظم شد که نامنظم شدن سیکل‌ها یکی از علائم وجود فولیکول‌های کیستیک در تخمدان است. بعد از درمان با عصاره رازیانه سیکل‌ها دوباره منظم شد (جدول شماره ۱).

سیکل‌ها در بین روزهای ۲۳ تا ۲۸ که مربوط به اوایل القا توسط P است، منظم‌اند. روز ۳۵ تا ۴۰ مربوط به اواخر القا توسط P است که نشان می‌دهد فازها به هم ریخته‌اند. روز ۵۸ تا ۶۳ مربوط به اواخر درمان با عصاره رازیانه است که نشان می‌دهد فازها دوباره منظم شده‌اند.



تصویر ۴. مقایسه تعداد فولیکول‌های آنترال در گروه‌های مختلف آزمایشی RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.



تصویر ۱. مقایسه میانگین وزنی موش‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی. RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

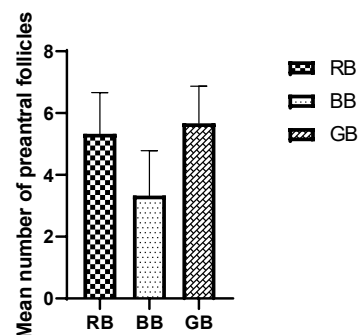
خشک حاصل شد که نشان‌دهنده بازدهی ۴/۷ درصدی است.

نتایج سمیت حاد

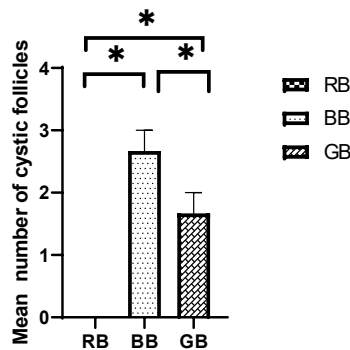
تغییری در ظاهر فیزیکی موش‌ها (پوست و خز) و تنفس مشاهده نشد. علائم بیماری (لرزش، تشنج، اسهال و رخوت) در موش‌ها دیده نشد. میانگین وزنی در روزهای اول، هفتم و چهاردهم در گروه درمانی با رازیانه افزایش یافت، ولی این افزایش معنی‌دار نبود.

بررسی تغییرات وزن

میانگین وزنی در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نبود ($P=0/151$). میانگین وزنی در گروه درمانی با عصاره رازیانه نسبت به گروه PCOS تغییر معنی‌داری نداشت ($P=0/955$) (تصویر شماره ۱).



تصویر ۳. مقایسه تعداد فولیکول‌های پری آنترال در گروه‌های مختلف آزمایشی RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.



تصویر ۶. مقایسه تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه‌های مختلف آزمایشی RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

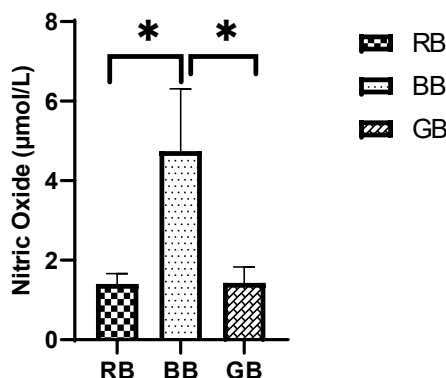
$P < 0.05^*$

تجویز رازیانه موجب افزایش تعداد فولیکول‌های پری آنترال شد که این افزایش معنی‌دار نبود ($P = 0.304$) (تصویر شماره ۳).

تعداد فولیکول‌های آنترال در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل تفاوتی نداشت ($P = 0.952$). تجویز رازیانه موجب افزایش در تعداد فولیکول‌های آنترال شد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P = 0.070$) (تصویر شماره ۴).

مقایسه تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه‌های مختلف آزمایشی

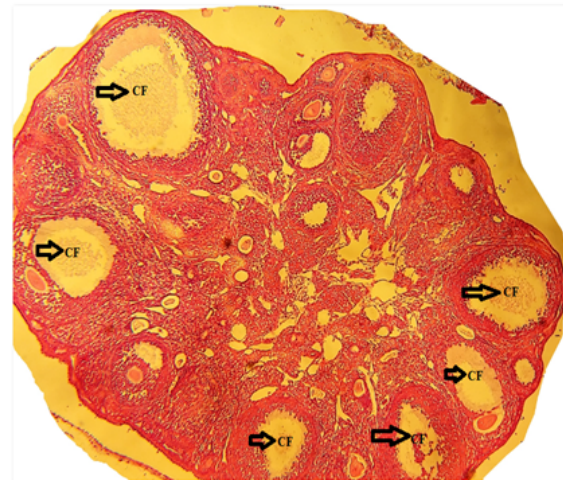
در فولیکول کیستیک درون حفره آنتروم تعداد زیادی ماکروفاز دیده شد. اووسیت به حالت کشیده و کناره‌های اووسیت به شکل



تصویر ۸. مقایسه میانگین ON در گروه‌های مختلف آزمایشی

RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

$P < 0.05^*$

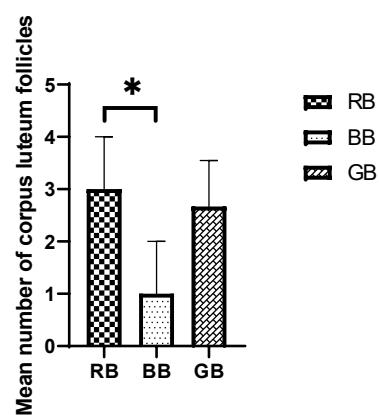


تصویر ۵. مقطع تخمدان گروه PCOS (بزرگ‌نمایی میکروسکوپی $\times 04$). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین CF: فولیکول کیستیک.

مقایسه تعداد فولیکول‌های سالم در گروه‌های مختلف آزمایشی:

فولیکول‌های پری آنترال (Preantral) و آنترال (Antral) جزو فولیکول‌های سالم محسوب می‌شوند. در فولیکول‌های موش‌های گروه کنترل منفی، سلول‌های گرانولوزا کاملاً مرتب در کنار یکدیگر قرار داشتند. در این گروه، درون فولیکول‌ها هیچ ماکروفازی دیده نشد و اووسیت حالت کروی داشت (تصویر شماره ۲).

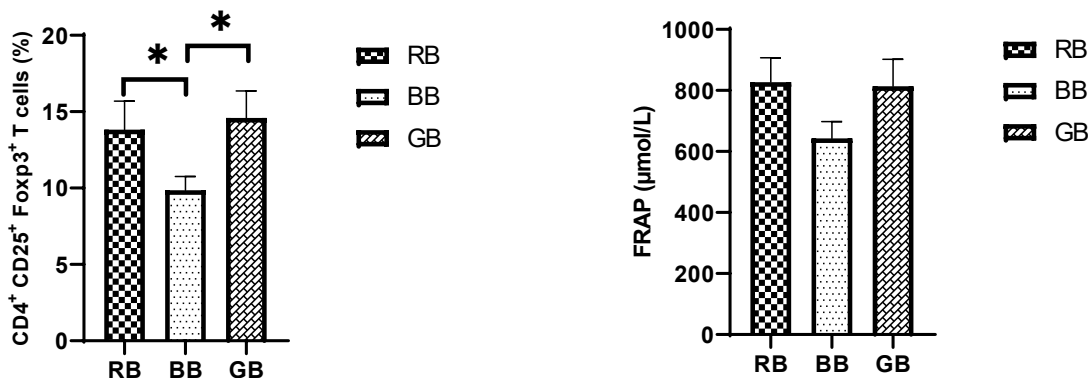
تعداد فولیکول‌های پری آنترال در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نشد ($P = 0.434$).



تصویر ۷. مقایسه تعداد جسم زرد در گروه‌های مختلف آزمایشی.

RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

$P < 0.05^*$



تصویر ۱۰. مقایسه میانگین Treg در گروه‌های مختلف آزمایشی

RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

$P < 0.05^*$

مقایسه تعداد جسم زرد در گروه‌های مختلف آزمایشی

تعداد جسم زرد در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P = 0.033$). تجویز رازیانه موجب افزایش تعداد جسم زرد شد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P = 0.09$) (تصویر شماره ۷).

اثر عصاره هیدروالکلی رازیانه بر غلظت NO

غلظت NO در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P = 0.001$). در گروه درمانی با رازیانه غلظت NO نسبت به گروه PCOS کاهش معنی‌داری داشت ($P = 0.002$) (تصویر شماره ۸).

اثر عصاره رازیانه بر میزان FRAP

میزان FRAP در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، ولی این کاهش معنی‌دار نبود ($P = 0.68$). میزان FRAP در گروه درمانی با رازیانه نسبت به گروه PCOS افزایش یافت، ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P = 0.57$) (تصویر شماره ۹).

مقایسه میانگین Treg در گروه‌های مختلف آزمایشی:

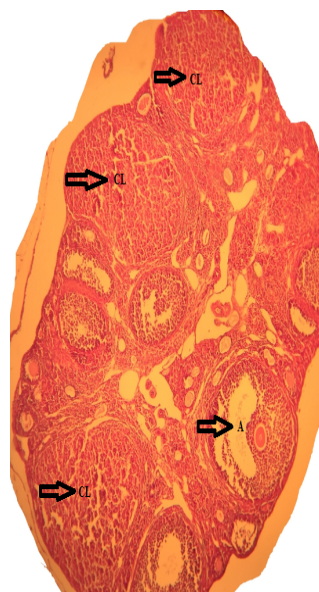
تعداد سلول‌های Treg در موش‌های مبتلا به PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P = 0.008$). درمان با رازیانه تعداد سلول‌های Treg را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P = 0.003$) (تصویر شماره ۱۰).



تصویر ۹. مقایسه میانگین FRAP در گروه‌های مختلف آزمایشی

RB: کنترل منفی؛ BB: گروه PCOS درمان‌نشده؛ GB: گروه PCOS درمان‌شده با رازیانه.

مضرس بودند (تصویر شماره ۵). تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P = 0.0001$). تجویز رازیانه موجب کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های کیستیک شد ($P = 0.005$) (تصویر شماره ۶).



تصویر ۱۱. مقطع تخمدان گروه PCOS درمان‌شده با عصاره هیدروالکلی رازیانه (بزرگ‌نمایی میکروسکوپی $40\times$).

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین
A: فولیکول آنترال، CL: جسم زرد.

جدول ۱. الگوی سیکل های جنسی در سه گروه مورد مطالعه در سه دوره زمانی

کنترل منفی														
سیکل ها														
پرو استروس *														
استروس *														
مت استروس *														
دی استروس *														
سن (روز)	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲
کنترل مثبت														
سیکل ها														
پرو استروس *														
استروس *														
مت استروس *														
دی استروس *														
سن (روز)	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲
درمان با رازیانه														
سیکل ها														
پرو استروس *														
استروس *														
مت استروس *														
دی استروس *														
سن (روز)	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲



بحث

افزایش معنی دار تعداد فولیکول های کیستیک و کاهش معنی دار تعداد جسم زرد شد. این نتایج حاکی از القای موفق PCOS در مدل حیوانی مطالعه حاضر است. سیکل های جنسی بعد از درمان با عصاره رازیانه دوباره منظم شد که نشان دهنده اثربخشی عصاره هیدروالکلی رازیانه در کاهش علائم PCOS است (تصویر شماره ۱۱).

رازیانه گیاهی با خواص ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و فیتواستروژنی است [۱۱، ۱۰]. تجویز عصاره رازیانه به طور معنی داری، تعداد فولیکول های کیستیک را کاهش داد.

یکی از مشخصات مهم این بیماری کاهش در میزان تخمک گذاری است و این امر باعث می شود که تعداد جسم زرد در تخمدان های پلی کیستیک به میزان قابل توجهی کاهش یابد. میزان پروژسترون نیز در PCOS کاهش چشمگیری دارد که علت این امر را می توان به کاهش یا عدم جسم زرد تخمدان ربط

سندرم تخمدان پلی کیستیک، شایع ترین اختلال اندوکراین زنان در سنین باروری و شایع ترین علت ناباروری ناشی از عدم تخمک گذاری است. مطالعات متعددی برای کاهش و جلوگیری از عوارض این بیماری صورت گرفته است [۲۰]. در این مطالعه، اثر عصاره هیدروالکلی رازیانه بر تعدادی از فاکتورهای التهابی در مدل موشی سندرم تخمدان پلی کیستیک بررسی شد.

عدم مرگومیر و عدم تغییرات فیزیکی و فیزیولوژیک در تست سمیت حاد نشان دهنده بی خطر بودن غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره رازیانه بود و از این رو این غلظت به عنوان غلظت درمانی به کار رفت.

القای PCOS در موش ها باعث نامنظم شدن سیکل های جنسی،



داد [۲۱]. مطالعات حاکی از آن است که ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان با فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به کاهش استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان و کاهش تعداد فولیکول‌های کیستیک در این بافت منجر شوند [۲۲].

آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی، عوارض ناشی از هیپرآندروژنیسم به دنبال القای PCOS در موش‌ها را نیز کاهش می‌دهند [۲۳]. خاصیت آنتی‌آندروژنی گیاهان نیز با القای فیدبک منفی بر (LH) (Luteinizing hormone)، میزان ترشح آندروژن‌ها را کاهش می‌دهند. کاهش آندروژن‌ها منجر به سنتز کمتر LH می‌شود و از تأثیر غالب LH بر FSH (Follicle-stimulating hormone) می‌کاهد که خود می‌تواند دلیلی بر راه اندازی مجدد مسیر طبیعی هورمون‌های چرخه جنسی و بروز تخمک‌گذاری در PCOS باشد [۲۴].

در مطالعه‌ای کوچصفهانی و همکاران نشان دادند که سم زنبور عسل با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در رت‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک باعث افزایش تعداد فولیکول‌های کوچک و پیدایش اجسام زرد در تخمدان شده است [۲۵]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی هسته انگور به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی باعث افزایش تعداد جسم زرد گردید [۲۶]. در این مطالعه نیز عصاره رازیانه احتمالاً به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی از طریق کاهش نیتریک اکساید باعث تشکیل اجسام زرد در تخمدان پلی‌کیستیک شده است.

در این مطالعه میزان رادیکال آزاد NO در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت. تجویز عصاره رازیانه باعث کاهش معنی‌دار نیتریک اکساید نسبت به گروه PCOS شد.

تولید بیش از حد NO در رحم می‌تواند به التهاب و سقط جنین منجر شود [۲۷]. استرس اکسیداتیو در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نقش مهمی در تغییر ساختار فولیکولی و رشد بیش‌ازحد بافت مزانشیم تخمدان دارد. رادیکال‌های آزاد با ایجاد جهش در گیرنده هورمون FSH نیز به تغییر پاسخ فولیکول‌های تخمدانی و تغییر فرآیندهای مولکولی تخمک‌گذاری منجر می‌شود [۲۸].

نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد سلول‌های Treg در موش‌های مبتلا به PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت و تجویز عصاره رازیانه این سلول‌ها را به طور معنی‌داری افزایش داد. این افزایش می‌تواند به علت اثر ترانس آنتول باشد که جزء اصلی رازیانه است [۱۲].

سیستم ایمنی به واسطه فراخوانی سلول‌ها و مولکول‌های تنظیمی به مقابله با متغیرهای سلولی در بدن می‌پردازد و میان پاسخ ایمنی مؤثر و واکنش‌های التهابی کنترل‌نشده تعادل برقرار می‌کند. یکی از سلول‌های اصلی تنظیمی لنفوسیت‌های Treg

هستند که نقش مهمی در جلوگیری از التهاب دارند و باعث می‌شوند که مادر قدرت تحمل جنین را داشته باشد. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به PCOS میزان Treg نسبت به افراد سالم کاهش می‌یابد که نتیجه آن می‌تواند بروز التهاب مزمن خفیف در این بیماران باشد که به عنوان یک مکانیسم جدید در پاتوژنز PCOS پیشنهاد می‌شود و نقش سیستم ایمنی در این بیماری را مطرح می‌کند [۲۹].

نتیجه‌گیری

با توجه به طبیعی شدن مراحل سیکل جنسی، کاهش تعداد فولیکول‌های کیستیک و افزایش جسم زرد پس از تجویز عصاره رازیانه در این مطالعه، یکی از مکانیسم‌های احتمالی این تغییرات، کاهش رادیکال آزاد NO و افزایش تعداد سلول‌های Treg است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه، مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک بود و با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1397.312 تصویب شد.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پروژه تحقیقاتی با کد ۳۱۷۵ است. هزینه انجام این تحقیق را معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک تأمین کرده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادهای کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) را داشتند.

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی درباره پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک است. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و شورای پژوهشی دانشگاه به دلیل تأمین مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- [1] Abinaya S, Siva D, Sabitha R, Achiraman Sh. An overview of hyperandrogenism in PCOS and the prospective underlying factors. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci*. 2019; 15(1):179-86. [DOI:10.26479/2019.0501.18]
- [2] Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health*. 2011; 3:25-35. [DOI:10.2147/IJWH.S11304] [PMID] [PMCID]
- [3] Brazdova A, Senechal H, Peltre G, Poncet P. Immune aspects of female infertility. *Int J Fertil Steril*. 2016; 10(1):1-10. [DOI:10.22074/ijfs.2016.4762] [PMID] [PMCID]
- [4] Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol (Baltimore, Md : 1950)*. 2005; 174(1):164-73. [DOI:10.4049/jimmunol.174.1.164] [PMID] [PMCID]
- [5] Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: A new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*. 2009; 15(5):517-35. [DOI:10.1093/humupd/dmp004] [PMID] [PMCID]
- [6] Hatzigelaki E, Pergialiotis V, Kannenberg JM, Trakakis E, Tsiavou A, Markgraf DF, et al. Association between biomarkers of low-grade inflammation and sex hormones in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019. [DOI:10.1055/a-0992-9114] [PMID]
- [7] Motta AB. Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 119(3-5):105-11. [DOI:10.1016/j.jsbmb.2010.02.015] [PMID]
- [8] Luchetti CG, Mikó E, Szekeres-Bartho J, Paz DA, Motta AB. Dehydroepiandrosterone and metformin modulate Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008; 111(3-5):200-7. [DOI:10.1016/j.jsbmb.2008.06.007] [PMID]
- [9] Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008; 89(3):505-22. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2007.09.041] [PMID]
- [10] Lee HS, Kang P, Kim KY, Seol GH. Foeniculum vulgare Mill. Protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through ERK-dependent NF- κ B activation. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2015; 19(2):183-9. [DOI:10.4196/kjpp.2015.19.2.183] [PMID] [PMCID]
- [11] Sadrefozalayi S, Farokhi F. Effect of the aqueous extract of Foeniculum vulgare (fennel) on the kidney in experimental PCOS female rats. *Avicenna J Phytomed*. 2014; 4(2):110-7. [PMID] [PMCID]
- [12] Zhang S, Chen X, Devshilt I, Yun Q, Huang C, An L, et al. Fennel main constituent, transanethole treatment against LPS-induced acute lung injury by regulation of Th17/Treg function. *Mol Med Rep*. 2018; 18(2):1369-76. [DOI:10.3892/mmr.2018.9149] [PMID] [PMCID]
- [13] Khazaei M, Montaseri A, Khazaei MR, Khanahmadi M. Study of Foeniculum vulgare effect on folliculogenesis in female mice. *Int J Fertil Steril*. 2011; 5(3):122-7. [PMID] [PMCID]
- [14] Saleem U, Amin S, Ahmad B, Azeem H, Anwar F, Mary S. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of Saccharum munja Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicol Rep*. 2017; 4:580-5. [DOI:10.1016/j.toxrep.2017.10.005] [PMID] [PMCID]
- [15] Salimi-Asl M, Mozdarani H, Kadivar M. Up-regulation of miR-21 and 146a expression and increased DNA damage frequency in a mouse model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Biol Impacts: BI*. 2016; 6(2):85-91. [DOI:10.15171/bi.2016.12] [PMID] [PMCID]
- [16] Sadoughi SD. [Effects of crocin on ovarian follicle and serum sex hormone in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rat model (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2017; 17(2):198-210. <http://jarums.arums.ac.ir/article-1-1377-en.html>
- [17] Mosayebi G, Ghazavi A, Khazaei MR, Payani MA. [Effect of vitamin E on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mouse (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2006; 9(1):68-75. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-259-fa.html>
- [18] Palizvan MR, Khademi Sh, Ghazavi A, Mosayebi Gh. [Correlation of two way active avoidance learning with Nitric Oxide and Ferric reduction/antioxidant power in rats (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2006; 9(4):1-8. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-61-fa.html>
- [19] Nasri F, Doroudchi M, Namavar Jahromi B, Gharesi-Fard B. T helper cells profile and CD4+CD25+Foxp3+Regulatory T cells in polycystic ovary syndrome. *Iran J Immunol*. 2018; 15(3):175-85. [DOI:10.22034/IJI.2018.39387] [PMID]
- [20] Pahlevani P, Mosavi SM, Rastgoo Haghi AR, Lahotian H, Esna Ashari F, Alizadeh Z. [Study of the effects of stachys lvanulifolia alcoholic extract on histomorphometry of endometrium in polycystic ovarian syndrome rat model (Persian)]. *Avicenna J Clin Med*. 2016; 23(1):40-8. <http://sjh.umsha.ac.ir/article-1-855-en.html>
- [21] Padua MB, Tekin S, Spencer TE, Hansen PJ. Actions of progesterone on uterine immunosuppression and endometrial gland development in the Uterine Gland Knockout (UGKO) ewe. *Mol Reprod Dev*. 2005; 71(3):347-57. [DOI:10.1002/mrd.20301] [PMID]
- [22] Yilmaz N, Inal HA, Gorkem U, Yilmaz S, Sargin A, Turkmani A. Follicular fluid total antioxidant capacity in patient with PCOS. *Fertil Steril*. 2013; 100(Suppl. 3):S356. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.07.838]
- [23] Ahmadi A, Mostafavi M, Kalantari Hesari A. [Histological studies of the effect of licorice root hydroalcoholic extract on the structure of polycystic ovary syndrome in mice following hyperandrogenism induced by letrozole (Persian)]. *Stud Med Sci*. 2019; 29(12):857-68. <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-4603-en.html>
- [24] Armanini D, Mattarello MJ, Fiore C, Bonanni G, Scaroni C, Sartorato P, et al. [Licorice reduces serum testosterone in healthy women (Persian)]. *Steroids*. 2004; 69(11-12):763-6. [DOI:10.1016/j.steroids.2004.09.005] [PMID]
- [25] Mohseni Kouchesfahani H, Nabyooni M, Adham H. [Investigating the therapeutic effect of Bee venom on polycystic ovarian syndrome in rats (Persian)]. *Pejouhandeh*. 2010; 15(1):1-6. <http://pajoohande.sbmua.ac.ir/article-1-868-en.html>
- [26] Mohseni Kouchesfahani H, Parivar K, Salmabadi Z. [Effect of hydroalcoholic grape seed extract (Vitis vinifera L.) on polycystic ovarian syndrome in female Wistar rat (Persian)]. *J Cell Tissue*. 2015; 6(2):153-64. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?ID=265203>
- [27] Cella M, Farina MG, Dominguez Rubio AP, Di Girolamo G, Ribeiro ML, Franchi AM. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(4):844-55. [DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.00911.x] [PMID] [PMCID]
- [28] Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, Agarwal A. Female infertility and antioxidants. *Curr Womens Health Rev*. 2010; 6(2):84-95. [DOI:10.2174/157340410791321381]
- [29] Krishna MB, Joseph A, Subramaniam AG, Gupta A, Pillai SM, Laloraya M. Reduced Tregs in peripheral blood of PCOS patients - a consequence of aberrant IL2 signaling. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100(1):282-92. [DOI:10.1210/jc.2014-2401] [PMID]