

The effect of curcumin on the estradiol valerate-induced polycystic ovary in rats

Nabiuni M^{1*}, Mohammadi S², Kayedpoor P², Karimzadeh L³

1- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Kharazmi, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Kharazmi, Tehran, I. R. Iran.

3- Laboratory of Animal Center & Cellular and Molecular Research Laboratory, Faculty of Biological Sciences, University of Kharazmi, Tehran, I. R. Iran.

Received May 18, 2014; Accepted October 29, 2014

Abstract:

Background: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a syndrome with complex endocrine and metabolic disorders, which is characterized by chronic anovulation, polycystic ovary and hyperandrogenism. Curcumin is a substance with antioxidant and anti-inflammatory effects. This study aimed to examine the therapeutic effect of curcumin on polycystic ovary syndrome in adult rats.

Materials and Methods: In this experimental study, PCOS was induced in adult female Wistar rats (170 g) by subcutaneous injection of estradiol valerate (2 mg/kg). The control group received no injection. At the end of 60th day, the rats were divided into control, PCOS and curcumin-treated PCOS (100, 200, 300 and 400 mg/kg) groups. After 14 days of intraperitoneal curcumin treatment, blood and ovary samples of all groups were taken for histological and serological studies.

Results: The thickness of the theca layer, primordial follicles and number of cysts were significantly decreased in high-dose curcumin treated ovaries compared to the PCOS group. Moreover, the appearance of corpus luteums as the main sign of recurrent ovulation was established. The serological analyses showed an increase in FSH and progesterone and a decrease in LH, estradiol and testosterone compared to the PCOS.

Conclusion: The results indicate that curcumin may be a useful agent for improving the PCOS and initiation of ovulation through its various antioxidant and anti-inflammatory effects.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, Estradiol, Corpus luteum, Curcumin

*** Corresponding Author.**

Email: devbiokharazmi@gmail.com

Tel: 0098 912 660 9337

Fax: 0098 261 457 9600

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2015; Vol. 18, No 6, Pages 515-523

Please cite this article as: Nabiuni M, Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh L. The effect of curcumin on the estradiol valerate-induced polycystic ovary in rats. *Feyz* 2015; 18(6): 515-23.

تأثیر کورکومین بر تخدمان پلیکیستیک القا شده با استرادیول والرات در موش صحرایی

۱* محمد نبیونی ، ۲شیما محمدی ، ۳پروین کایدپور ، ۴لطیفه کریمزاده

خلاصه:

سابقه و هدف: سندروم تخدمان پلیکیستیک (PCOS) سندرومی با اختلالات اندوکرینی و متابولیکی پیچیده است که با عدم تخمک-گذاری مزمن، تخدمان پلیکیستیک و هیبر آندرودرژنیسم مشخص می‌شود. کورکومین ماده‌ای با اثر آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. در این مطالعه اثر درمانی کورکومین بر سندروم تخدمان پلیکیستیک در موش‌های صحرایی بالغ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی القای سندروم به واسطه تزریق زیرپوستی استرادیول والرات با دوز ۶۰ mg/kg به ۲ سر موش صحرایی ماده ویستار ۱۷۰ گرمی انجام گرفت. گروه کنترل هیچ تزریقی دریافت نکرد. پس از ۶۰ روز، حیوانات به گروه‌های کنترل، PCOS و PCOS تیمار شده با کورکومین (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. پس از ۱۴ روز تیمار درون‌صفاقی کورکومین، خون و تخدمان‌های همه گروه‌ها به منظور مطالعات بافت شناسی و سرولوژیک برداشته شدند.

نتایج: تخدمان‌های تیمار شده با غلظت‌های بالای کورکومین افزایش لایه گرانولوز، کاهش غلاف فولیکولی، نبود کیست و کاهش فولیکول‌های بدوي را به صورت معنی‌داری نسبت به گروه PCOS نشان دادند. هم‌چنین، اجسام زرد که در تخدمان پلیکیستیک به ندرت وجود داشتند، ظاهر شد که می‌تواند نشان‌دهنده آغاز مجدد اوولاسیون باشد. تغییرات سرولوژیک نیز به صورت افزایش FSH و پروژسترون، کاهش LH استرادیول و تستوسترون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود کورکومین با اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود بتواند در تعديل علائم PCOS موثر واقع شده و باعث آغاز مجدد اوولاسیون گردد.

واژگان کلیدی: سندروم تخدمان پلیکیستیک، استرادیول، جسم زرد، کورکومین

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳، صفحات ۵۱۵-۵۲۳

مقدمه

سندروم تخدمان پلیکیستیک سندرومی با اختلالات اندوکرینی و متابولیکی پیچیده است که با عدم تخمک-گذاری مزمن، تخدمان پلیکیستیک و علایم پاتولوژیکی مانند هیبر آندرودرژنیسم مشخص می‌شود. این سندروم اثرات منفی قابل توجهی بر فیزیولوژی و متابولیسم بدن از قبیل مقاومت به انسولین، هیبرانسولینیما، چاقی شکمی، و فشار خون بالا دارد و در طولانی مدت منجر به بروز دیابت نوع دو، هیپرپلازی آندومتر و بیماری‌های سیستم قلبی عروقی می‌شود [۱]. میزان هورمون LH در زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌باید که بهدلیل افزایش در میزان و تناوب ترشح این هورمون است.

^۱ دانشیار، گروه سلوی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلوی و تکوینی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

^۳ کارشناس ارشد زیست شناسی سلوی و تکوینی، مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و آزمایشگاه تحقیقاتی سلوی تکوینی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

***نشان نویسنده مسئول:**

کرج، میدان دانشگاه، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، دانشکده علوم زیستی، گروه سلوی و مولکولی

تلفن: ۰۹۱۲ ۶۶۰ ۹۳۳۷ دوچرخه: ۰۴۵۷۹۶۰۰

پست الکترونیک: devbiokharazmi@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۸/۷ تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۸

زمانی که غلظت هورمون LH نسبت به FSH افزایش باید،

تخدمان‌ها به طور ترجیحی سنتز آنдрودرژن‌ها را افزایش می‌دهند.

میزان انسولین و فاکتورهای شبیه انسولینی (IGFs) نیز در زنان

متبلله PCOS افزایش می‌باید که موجب افزایش سنتز آندرودرژن

در سلول‌های تکا و در نتیجه تقویت عملکرد LH خواهد شد [۲].

هم‌چنین، انسولین سنتز و ترشح کبدی گلوبولین متصل شونده به

هورمون‌های جنسی را کاهش می‌دهد. گلوبولین متصل شونده به

هورمون‌های جنسی به تستوسترون متصل می‌شود؛ بنابراین کاهش

آن باعث افزایش مقدار آزاد تستوسترون می‌شود. در واقع فاکتوری

که باعث افزایش ترشح تستوسترون در PCOS می‌شود افزایش

فعالیت آنزیم‌هایی است که در سنتز تستوسترون دخیل هستند [۳].

کاهش کلائز در دیواره فولیکولی در زمان تخمک-گذاری برای

آزاد کردن تخمک لازم است. در این فرآیند متالوپروتئینازهای

ماتریکس (MMP) که باعث تفکیک کلائز می‌شوند، افزایش

یافته و لیزیل اکسیداز (LOX) که یک cross-linker بین کلائز

و الاستین است و به طور نرمال در فرآیند ترمیم و نوسازی کلائز

دخیل می‌باشد، کاهش می‌باید. در پاسخ به آندرودرژن، فعالیت

MMP2 به طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند و از طرفی فعالیت

LOX افزایش می‌باید، در نتیجه تفکیک کلائز و پاره شدن

فولیکول مهار می‌شود. این امر نشان‌دهنده یکی از مکانیسم‌های

تقریبی ۱۷۰ گرم استفاده شد که در فقس‌های مخصوص و تحت شرایط محیطی و درجه حرارت مطلوب ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنابی و تاریکی ۱۲ ساعته و با دسترسی آزادانه به غذا و آب نگهداری می‌شدند. در طی همه مراحل آزمایش طبق اصول نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با حیوانات رفتار شد. مدل سندروم تخمدان پلی کیستیک را می‌توان به کمک روش هورمونی و غیر هورمونی از جمله هورمون تستوسترون، دهیدرو اپی آندروستون (DHA)، آدنوفکورتیکوتروپین (ACTH)، استرادیول والرات (EV)، استفاده از استرس سرما و نیز استفاده از نور مداوم القا کرد [۱۲]. در این تحقیق از روش القاء هورمونی با استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان، تهران) استفاده شد. حیوانات انتخاب شده پس از تست اسمیر واژینال روزانه به مدت پانزده روز، دارای ۳ دوره متواالی منظم سیکل استروس (هر سیکل مشتمل از چهار مرحله پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس) بودند. به تمامی حیوانات در مرحله استروس سیکل تولید مثلی، بهمیزان ۲ میلی‌گرم استرادیول والرات به صورت زیر پوستی و یکبار تزریق شد. بهمنظور اطمینان از القای کامل این سندروم، پس از تزریق روزانه تست اسمیر واژینال تا تغییرات سیکل استروس و نامنظم شدن آن و رسیدن به مرحله اسمیر واژینال شاخی پایدار Persistent Vaginal Cornification (PVC) بعنوان مهم‌ترین علامت القای سندروم ادامه پیدا کرد [۱۳]. برای تعیین دوز مناسب کورکومین (سیگما)، غلظت ماده‌ای که سبب مرگ ۵۰ درصد از موش‌ها شد بعنوان LD₅₀ در نظر گرفته شد که در این آزمایش غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم کورکومین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش بعنوان غلظت LD₅₀ تعیین گردید. بهمین دلیل غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بعنوان دوزهای درمانی انتخاب شدند. موش‌ها به سه گروه ۱۲ تایی تیمار (شامل دوزهای mg/kg ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰) و شاهد و کنترل تقسیم شدند. موش‌های تیمار روزانه به مدت ۱۴ روز متواالی کورکومین که در DMSO به عنوان حلal حل شده بود به کمک سرنگ انسولین و به صورت درون صفاتی دریافت نمودند [۱۴] به موش‌های گروه شاهد نیز DMSO تزریق شد. موش‌های گروه کنترل هیچ تزریقی دریافت نکردند. در پایان مدت ۱۴ روز پس از تیمار موش‌ها کشته شدند و تخمدان‌های آنها جهت بررسی موقولوژی/مورفومتری برداشته شد. تخمدان‌ها پس از خارج شدن از بدن موش و حذف بافت‌های اضافی در محلول بوئن و فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. پس از قالب‌گیری به صورت سریالی و با ضخامت ۷ میکرون برش داده شده و با رنگ هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند. پس از

سلولی عدم تخمک‌گذاری است [۴]. کورکومین (Turmeric) یا همان زردچوبه در زبان فارسی با فرمول [bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione-1,7] مولکول زردرنگ، فلورسنت و هیدروفوپریک است که با سرعت می‌تواند وارد غشاء سلول شود [۶،۵]. زردچوبه از قرن‌ها پیش برای درمان بیماری‌های نظری بیماری‌های کبدی، پوستی و ویروسی مورد استفاده بوده است. مطالعاتی که در سطح بروون- و درون‌تنی صورت گرفته‌اند خواص آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد روماتیسمی و ضد التهابی کورکومین را اثبات نموده‌اند [۷]. اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی کورکومین به طور عمده به خاطر اثرات آنتی اکسیدانی و تاثیر آن روی آنزیم‌های سلولی، مهار مسیرهای ارسال سیگنانل در سطوح مختلف، آنتی‌بیوتیک و چسبندگی سلول‌هاست [۸]. کورکومین با پروتئین کیناز C و تنظیم کلسیم ارتباط پیدا می‌کند. افزایش کلسیم سیتوزول ممکن است سبب افزایش اکسیژن فعال (ROS) گردد. و اثر آنتی‌اکسیدان و آنتی‌آنتی‌بیوتیک کورکومین به جهت مهار ورود کلسیم و مهار پروتئین کیناز C می‌باشد. تحقیقات متعددی مبنی بر خواص آنتی‌اکسیدان منحصر به فرد، اثر ضد موتابیون، اثر ضد تومور و خاصیت آنتی کارسینوژیک و ضد کلسترول خون کورکومین C گزارش شده است [۹]. اثر آنتی اکسیدانی کورکومین با ویتامین C و ویتامین E برابر می‌باشد [۱۰]. کورکومین با مهار آنتی‌بیوتیک بافت سرطانی باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده و همچنین فعالیت تلومرازی را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد. این ماده با مهار فاکتور رشد سلول‌های اندوتیال عروقی (VEGF)، گیرنده اختصاصی آن و آنتی‌بیوتین از آنتی‌بیوتیک و تشکیل عروق خونی جدید در سلول‌های توموری جلوگیری نموده و رشد آنها را متوقف می‌کند [۸]. همچنین، در مدل حیوانی التهاب، کورکومین متabolیسم آراسیدونیک اسید و التهاب را در اپی درم موش از طریق کاهش فعالیت مسیرهای سیکلواکسیژنаз و لیپواکسیژناز مهار می‌کند [۱۱]. در مطالعه حاضر با توجه به نقش استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی در ایجاد و پیش‌برد سندروم مذکور و نیز خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی کورکومین، اثرات این محصول گیاهی در بهبود علایم بافتی تخمدان پلی‌کیستیک شده به وسیله استرادیول والرات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این بررسی تجربی که در سال ۱۳۹۲ در مرکز تکثیر، نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی انجام پذیرفت از ۶۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستان با وزن

مخلوطی از پرواستروس- استروس را نشان دادند. در روزهای بین ۳ تا ۲۰ اسمری واژینال به صورت مخلوطی از سلول‌ها با موکوس فراوان بود و هیچ کدام از حیوانات مرحله استروس را نشان ندادند. در برخی از موش‌ها در این دوره مخلوطی از پرواستروس- استروس دیده شد. الگوی منظمی از سیکل تولید مثلی در این دوره در حیوانات مشاهده نشد. از روز بیستم حیوانات شروع به نشان دادن الگوی اسمری استروس نمودند و از روز ۲۵ تمامی موش‌ها در مرحله استروس پایدار یا PVC قرار گرفتند. موش‌های گروه شاهد در این مدت سیکل طبیعی خود را ادامه دادند. در تخدمان‌های تیمار شده با EV در موش‌های بالغ، فولیکول‌های بزرگ کیستیک با لایه گرانولوزای باریک در حد ۲ یا ۳ لایه سلولی و تعداد کمی فولیکول‌های بدبوی که از مشخصه‌های PCOS است و همچنین تعداد کمی جسم زرد مشاهده شد. در گروه شاهد برخلاف گروه تیمار، تخدمان‌ها قادر کیست و مملو از فولیکول‌های بدبوی و جسم زرد بود که نشان‌دهنده تخمک‌گذاری طبیعی است. بنابراین، تیمار تخدمان پس از ۶۰ روز با استفاده از EV منجر به عدم تخمک‌گذاری طبیعی، کیست و اختلال در تکوین طبیعی رشد فولیکولی شد (شکل شماره ۱). پس از تیمار تخدمان‌های پلی کیستیک شده با کورکومین، بررسی‌های مرفو لو- ژیک نشان داد که در دوز پایین‌تر این ماده (100 mg/kg) تعدادی کیست با اندازه‌های مختلف وجود دارد. با افزایش دوز کورکومین (دوزهای kg/mg : $200, 300, 400$) در تخدمان‌های تیمار شده هیچ کیستی مشاهده نشد، همچنین، تعداد جسم زرد که نشانه انجام و آغاز تخمک‌گذاری است در نمونه‌های تیمار شده افزایش یافت (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۱). در بررسی میزان تغییرات LH در گروه پلی کیستیک و همچنین تیمار (دوزهای 100 و 200 mg/kg) اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) مشاهده شد. در گروه، ولی در سایر دوزهای کورکومین (300 و 400 mg/kg) کاهش LH سطح سرمی نشان داد که این تغییر معنی‌دار نبوده است. در بررسی میزان تغییرات FSH در گروه‌های تحت مطالعه اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌ها مشاهده شد. افزایش معنی‌داری در اندازه هورمون FSH بین گروه پلی کیستیک شده با دوزهای $100, 200$ و 300 mg/kg ($P < 0.01$) بین گروه PCOS و تیمار مشاهده شد. در بررسی میزان تستوسترون در گروه‌های مورد مطالعه میزان تستوسترون در گروه پلی کیستیک شده اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) را با گروه تیمار شده با کورکومین نشان داد. در این بررسی میزان این هورمون در گروه‌های تحت تیمار اگرچه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، اما نسبت به گروه شاهد کاهش چشم‌گیری داشت. در بررسی میزان تغییرات هورمون

مشاهده مقاطع بافتی تخدمان در گروه‌های کنترل (در مرحله استروس از سیکل تولید مثلی)، PCOS و گروه تیمار شده با کورکومین، فولیکول‌ها از نظر مرحله‌ی رشد و تکوین و بر اساس ریخت‌شناسی و قطر فولیکول به ۶ گروه فولیکول‌های بدبوی (PMF)، فولیکول‌های اولیه (PF)، فولیکول‌های پیش آنترال کمتر از 600 میکرون (PAF)، فولیکول‌های کیستیک (CF) و اجسام زرد (CL) تقسیم شدند و مورد شمارش و بررسی قرار گرفتند. به‌منظور عدم شمارش مجدد یک فولیکول بزرگ، از هر 10 برش یک برش شمارش شد تا از دو بار شمارش فولیکول آنترال که هسته‌ای تقریباً به قطر 70 میکرون دارد، جلوگیری به عمل آید. شمارش تعداد کل فولیکول‌های هر دسته فولیکولی به‌وسیله‌ی فرمول پیشنهادی زیر انجام گرفت: $F = (A \times B / C)D$ (F= (AxB/C)D) = تعداد کل فولیکولی، A= تعداد فولیکول‌ها در هر برش، B= فاصله‌ی بین برش‌های شمارش شده، C= قطر اووسیت، و D= ضخامت برش-ها. هم‌چنین، آنالیزهای مورفومتریک جهت بررسی تغییرات لایه‌های سلولی گرانولوزا و غلاف فولیکولی در فولیکول‌های انترال با استفاده از عدسی چشمی مدرج انجام گرفت و نتایج معنی‌داری حاصل گردید. اندازه‌گیری لایه گرانولوزا به‌منظور یکسان نبودن در محیط یک فولیکول بر اساس پیش‌فرض پیشنهادی زیر صورت گرفت: اندازه‌ی لایه گرانولوزا در گروه فولیکولی آنترال (AF) فاصله‌ی اولین لایه سلولی گرانولوزا در مجاورت غلاف فولیکولی تا نزدیک‌ترین لایه به حفره‌ی آنتروم تشکیل شده در بخش روپرتوی کمپلکس اووسیت-کومولوس در نظر گرفته شد. به‌منظور تأیید القای سندروم تخدمان پلی کیستیک و بهبود آنها به کمک کورکومین با استفاده از سرنگ 2 میلی‌لیتر خون از قلب حیوانات اخذ شد. لوله‌های حاوی نمونه در بن ماری با دمای 37°C قرار گرفت. پس از لخته شدن، با استفاده از ساتریفیوژ 6000 دور در دقیقه به‌مدت 5 دقیقه سرم نمونه‌های خونی جدا شده و تا زمان آزمایشات سرولوژیک به‌روش Radioimmunoassay بررسی میزان تغییرات سایر هورمون‌ها در دمای 20°C - نگهداری شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از آزمون ANOVA یک‌طرفه و نرم افزار INSTAT استفاده شد و نمودارهای مربوطه از طریق برنامه نرم افزاری EXCEL رسم گردید.

نتایج

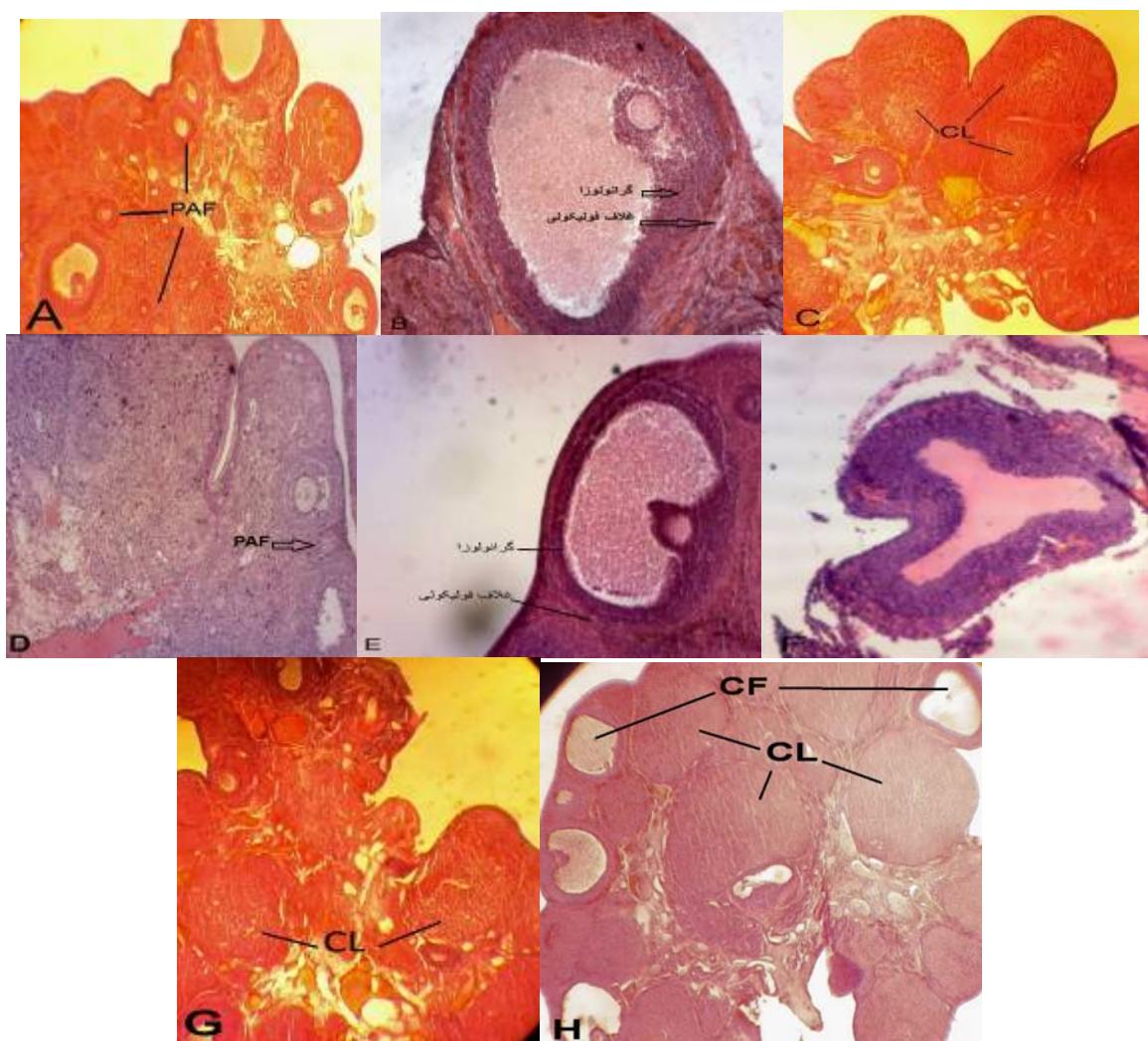
یک روز پس از تزریق استرادیول والرات، اکثر موش‌ها اسمری واژینال با مخلوطی از سلول‌ها را نشان دادند. در روز دوم پس از تزریق حدود دو سوم حیوانات اسمر استروس و یا

شاهد معنی دار بود. هم چنین، تعدادی جسم زرد در این گروه ظهور یافت که نشانه‌ی بهبودی نسبی تخمدان‌های گروه PCOS بود (نمودار شماره ۲). اندازه‌گیری ضخامت غلاف فولیکولی و لایه گرانولوزا در ۴ گروه کنترل، پلی‌کیستیک و PCOS تیمار شده با دوز بالا و پایین کورکومین، کاهش معنی داری ($P < 0.001$) در ضخامت غلاف فولیکولی بین گروه PCOS و تیمار با کورکومین نشان داد. در مقایسه لایه گرانولوزای گروه‌ها، نمونه‌های تیمار شده با دوز بالای کورکومین افزایش معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل نشان دادند، اما دوز پایین تغییرات معنی داری را نشان نداد (نمودار شماره ۳).

بحث

در این تحقیق القاء PCOS با استفاده از EV صورت گرفت و نتایج مشابهی از نظر تغییرات تعداد فولیکولی و مورفولوژی تخمدان همسو با نتایج برخی تحقیقات به دست آمد. Desjardins و همکاران پس از القا PCOS در موش‌های صحراوی گزارش کردند کیست‌های متعددی در تخمدان تشکیل شده است و منتشا این کیست‌ها از فولیکول‌های آترزی شده است. هم چنین، آنها مشاهده کردند لایه سلول‌های گرانولوزا دُزنه شده و لایه خارجی سلول تکا ضخیم‌تر شده است [۱۵]. طبق بررسی‌ها و مشاهدات کریم‌زاده و همکاران، افزایش عروق خون‌رسان به دلیل آنژیوژن در بخش استروما و لایه غلاف فولیکولی سبب پیشرفت استروئیدوژن و ضخیم شدن این لایه می‌شود. به علاوه، آندروژن بالا موجب هایپرتکازیسم و عدم اوولاسیون موفق می‌گردد [۱۶]. انسولین و IGF-1 و IGF-2 از جمله تنظیم‌کنندگان اتوکرین و پاراکرین سلول‌های T- Theca (بینایی) در انسان و موش صحراوی هستند و قادرند تکثیر و فعلیت استروئیدوژن این سلول‌ها را تحریک نمایند. انسولین و فاکتورهای شبه انسولینی موجب افزایش سنتز آندروژن در سلول‌های تک و سلول‌های گرانولوزا می‌شوند، هم چنین این هormون موجب افزایش تستوسترون موجود آزاد در جریان خون می‌شود. افزایش تولید آندروژن‌ها در نهایت موجب رشد فولیکولی می‌گردد و در نتیجه میزان LH افزایش پیدا می‌کند که این افزایش باعث افزایش وزن بدن و در نهایت کاهش آنژیوژن فولیکولی می‌شود [۱۷]. Thuma و Loucks در پژوهش خود به ابستگی هormون LH با چربی بدن اشاره کرده و کاهش تولید این هormون را به تغییرات چربی بدنی مرتبط دانسته‌اند [۱۸].

استرادیول در گروه‌های تحت بررسی اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) در گروه پلی‌کیستیک شده نسبت به گروه کنترل و تیمار دیده شد. و با وجود کاهش استرادیول در گروه‌های تحت تیمار اختلاف معنی داری در گروه تیمار دیده نشد. در بررسی تغییرات میزان هورمون پروژسترون در گروه‌ها اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) بین گروه پلی‌کیستیک شده با گروه تیمار شده (دوز ۱۰۰ و ۲۰۰) دیده شد. در دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ با وجود اینکه اختلاف معنی داری دیده نشد، اما در میزان هورمون افزایش دیده می‌شود. بدمنظور تعیین اثر کورکومین بر روی تکوین فولیکولی، فولیکول‌ها بر اساس مورفولوژی به ۶ گروه: ۱- فولیکول‌های بدبوی (PRI)، ۲- فولیکول‌های اولیه (PF)، ۳- فولیکول‌های پره آنترال (PA)، ۴- فولیکول‌های آنترال (A)، ۵- فولیکول‌های کیستیک (CF) و ۶- جسم زرد (CL) دسته‌بندی شدند. در بررسی‌های انجام شده و مقایسه گروه کنترل با گروه تیمار شده با EV تعداد فولیکول‌های کیستیک و فولیکول اولیه در گروه تیمار شده تفاوت معنی داری ($P < 0.001$) و تعداد فولیکول‌های کیستیک در سایر نمودارها اختلاف ($P < 0.01$) را نشان داد. در تخمدان‌های گروه تیمار شده با استرادیول والرات، تعدادی فولیکول‌های بزرگ کیستیک با لایه گرانولوزای نازک در حدود دو یا سه لایه سلولی مشاهده شد. در این گروه تعداد کمی جسم زرد که نشانه‌ی تخمک‌گذاری می‌باشد نیز مشاهده شد. در تخمدان‌های گروه شاهد تخمدان‌ها فاقد هرگونه کیست بوده و تعداد زیادی فولیکول در مراحل مختلف تکوین فولیکولی و هم‌چنین جسم زرد مشاهده شد. این نتایج گویای القای کامل فنوتیپ سندروم تخمدان پلی‌کیستیک در تخمدان‌هایی بود که ۶۰ روز پس از تیمار با EV مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار شماره ۱). موش‌های PCOS به مدت ۱۴ روز تحت تزریق کورکومین با دوز پایین mg/kg ۱۰۰ قرار گرفتند و گروه شاهد مربوطه به همان میزان DMSO دریافت نمودند. پس از این مدت تغییرات معنی داری ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$) در گروه تیمار شده با دوز پایین کورکومین در مقایسه با گروه EV مشاهده شد (نمودار شماره ۲). در همه گروه‌های تیمار شده با کورکومین (دوزهای ۳۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg) در مقایسه با گروه EV تغییرات معنی داری به میزان $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در همه گروه‌های فولیکولی (به جز فولیکول‌های بدبوی) دیده می‌شود. پس از این مدت، تعداد فولیکول‌های پیش آنترال و جسم زرد افزایش یافته و تعداد کیست‌ها کاهش یافت که این تغییرات نسبت به گروه

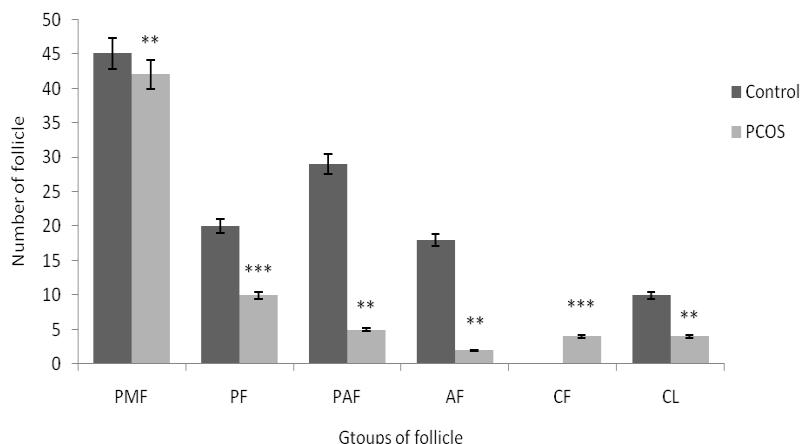


شکل شماره ۱- مقایسه تخمدان گروه کنترل (A,B,C) و تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با غلظت ۴۰۰ mg/kg BW کورکومین (G,H). در تصویر D کاهش فولیکول‌های کوچک در گروه تخمدان پلی کیستیک نسبت به گروه کنترل (A) دیده می‌شود. در تصویر E کاهش ضخامت لایه گریزولوزا و افزایش ضخامت غلاف فولیکولی نسبت به گروه کنترل (B) (Dideh می‌شود. در تصویر F کاهش ضخامت لایه گریزولوزا، در حالی که تخمدان گروه کنترل (C) بدون کیست و حاوی چند جسم زرد بود. تصویر G فتومیکروگراف تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با کورکومین هستند که ظهر جسم زرد در تصویر G و حضور تعدادی از فولیکول‌های کیستیک در کنار اجسام زرد در این گروه نشانه بھبود نسیی این سندروم نسبت به گروه PCOS می‌باشد. CL=جسم زرد، PAF=فولیکول پره آنtra، و CF=فولیکول کیستیک. (A,C, ,G,H: X100; B,D,E,F: X400)

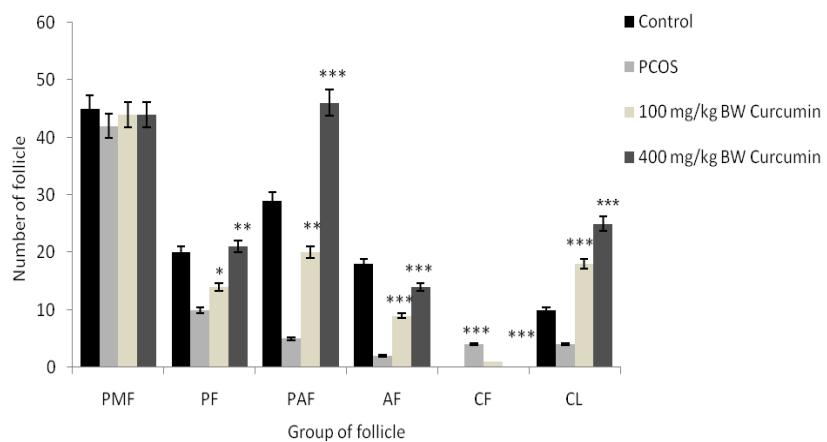
جدول شماره ۱- میزان سرمی FSH, LH, تستوسترون، پروژسترون، و استرادیول در موش‌های گروه PCOS و گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کورکومین نسبت به گروه کنترل مقایسه شده است. LH: Luteinizing Hormone, FSH: Follicle Stimulating Hormone, T: Testosterone, P4: Progesterone, E2: 17 β -estradiol

گروه	FSH(ng/ml)	LH(ng/ml)	T(ng/ml)	P4(ng/ml)	E2(ng/ml)
کنترل	۱۶۴۴/۷۶±۱۲۶/۶	۲/۳۶±۰/۱۵	۰/۷۳±۰/۰۳	۶۶/۰۳±۷/۷	۰/۲۷±۰/۰۱
PCOS	۴۷۶/۸۲±۱۲/۳***	۸/۱۶±۱/۰۵***	۱/۴۱±۰/۳*	۳۱/۱۲±۱/۷۶**	۰/۶۳±۰/۰۵***
۱۰۰mg/kg BW Curcumin	۴۳۱/۱۳±۲۹/۸۱***	۴±۰/۱***	۰/۸۶±۰/۰۳	۳۵/۶۹±۰/۰۷**	۰/۳۶±۰/۰۴
۲۰۰mg/kg BW Curcumin	۶۱۳/۲۴±۱۳/۰۵***	۳/۱۶±۰/۰۴***	۰/۸±۰/۰۱	۴۷/۳۶±۰/۸۸*	۰/۳±۰/۰۱
۳۰۰mg/kg BW Curcumin	۱۱۷۴/۰۵±۱۵.۹۵**	۲/۰۵±۰/۰۹	۰/۷۷±۰/۰۲	۵۰/۳۳±۰/۴۱	۰/۲۹±۰/۰۱
۴۰۰mg/kg BW Curcumin	۱۰۹۱/۲۱±۴۴.۹۷	۲/۳۹±۰/۱	۰/۷۵±۰/۰۱	۵۳/۹۵±۰/۲	۰/۲۶±۰/۰۱

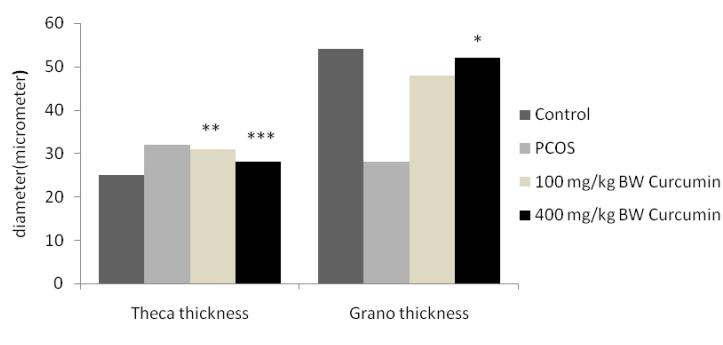
(***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05) $\bar{X} \pm SD$



نمودار شماره ۱- مورفومتری گروههای مختلف فولیکولی در تخمدانهای گروه کنترل و گروه پلی کیستیک ($n=12$). در تخمدان گروههای پلی کیستیک افزایش معنی داری در تعداد کیستها و کاهش معنی داری در تعداد جسم زرد مشاهده شد. ($***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$)
 PMF = فولیکول بدوی. PF = فولیکول اولیه. PAF = فولیکول پری آنترال. AF = فولیکول آنترال. CL = جسم زرد.



نمودار شماره ۲- مورفومتری گروههای مختلف فولیکولی در تخمدانهای گروه کنترل، گروه پلی کیستیک و گروه پلی کیستیک تیمارشده با غلظت، ۴۰۰ mg/kg BW کورکومین ($n=12$ در هر گروه). گروههای تیمار شده با کورکومین نسبت به گروه پلی کیستیک تفاوت های معنی داری نشان دادند. ($***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$) PMF = فولیکول بدوی. PF = فولیکول اولیه. PAF = فولیکول پری آنترال. AF = فولیکول آنترال. CL = جسم زرد.



نمودار شماره ۳- مورفومتری ضخامت لایه غلاف فولیکولی و گرانولوزا در تخمدان گروه کنترل، PCOS و تیمارشده با دوز بالا و پایین کورکومین. غلاف فولیکولی در نمونههای تیمار شده با کورکومین نسبت به گروه PCOS کاهش معنی داری را نشان می دهد. همچنین، ضخامت لایه گرانولوزا در نمونههای تیمار شده با کورکومین در مقایسه با گروه PCOS افزایش معنی داری را نشان می دهد ($***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$).

علایم بافتی تخدمان در سندروم تخدمان پلی کیستیک توسط Zhang و Karabulut می‌توان ابراز کرد که نتایج این بررسی (کاهش ضخامت لایه‌ی غلاف فولیکولی، افزایش لایه‌ی گرانولوزا و افزایش تعداد جسم زرد) مهر تاییدی بر مطالعات آنها مبنی از استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در درمان بیماران PCOS شد [۲۶، ۲۷]. بیان شده است که مصرف کورکومین با غلظت ۱۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جوندگان باعث کاهش التهاب پنجه پا می‌شود. [۲۸]. در یک مطالعه‌ی دیگر نشان داده شد که کورکومین به طور موثر بیان ژن سایتوکاین‌ها را در هر دو سطح mRNA و پروتئین مهار می‌کند و فعالیت NF-KB را کاهش می‌دهد [۲۹]. در مطالعه آنها نشان داده شد که کورکومین اثرات ضد افسردگی مانند را در موش CMS شده به دلیل توانایی ضد التهابی اش کاهش می‌دهد. با تکیه بر وجود علایم Low-Grade Inflammatory State در سندروم تخدمان پلی کیستیک که موجب ظهور علایمی از جمله افزایش سطح اندرودن‌های خون، افزایش آنزیوژن تخدمانی و افزایش ضخامت لایه‌ی غلاف فولیکولی می‌شود، در این تحقیق خواص ضد التهابی کورکومین بررسی شد. کورکومین با اثر بر روی اندازه تخدمان پلی کیستیک سبب کاهش حجم تخدمان به صورت ماقروسکوپی گردید. هم‌چنین، بر میزان هورمون تستوسترون، تعداد فولیکول‌ها و تعداد کیست‌ها موثر بوده و باعث کاهش آنها در گروه‌های تیمار شده با کورکومین شد. این بهبودی در غلظت‌های بالاتر چشم‌گیرتر بود.

نتیجه‌گیری

کاهش علایم بافتی سندروم تخدمان پلی کیستیک در موش صحرایی توسط کورکومین احتمالاً به دلیل خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی این محصول گیاهی است. به نظر می‌رسد کاهش میزان تستوسترون، کاهش ضخامت لایه‌ی غلاف فولیکولی و نیز افزایش تعداد جسم زرد در تخدمان‌های تیمار شده با کورکومین به صورت وابسته به غلظت شواهدی از افزایش میزان باروری را در سندروم تخدمان پلی کیستیک ارایه می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق که بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد، از حمایت مالی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی برخوردار بوده است.

References:

- [1] Upadhyia K, Trent M. Effects of polycystic ovary syndrome on health-related quality of life.

Sasikala توسط لرزه‌زول به مدت ۲۸ روز در موش‌های صحرایی گزارش کردند که رشد و نمو فولیکول‌ها در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است که این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد [۱۹]. نشان داده شده است که درمان با متغورمین تاثیری در سطح LH و FSH بیماران مبتلا به سندروم تخدمان پلی کیستیک ایجاد نمی‌کند [۲۰]. هم‌چنین، بیان شده است که کورکومین با القای آپوپتوز تکثیر سلول‌های تومور غده‌ی هیپوفیز را مهار می‌کند و تولید و آزاد شدن LH را کاهش می‌دهد. بنابراین، تیمار با کورکومین به عنوان یک روش جدید می‌تواند در اختلالات مربوط به افزایش این هورمون استفاده شود [۲۱]. از آنجا که افزایش غیر ریتیمک این هورمون در سندروم تخدمان پلی‌کیستیک موجب بروز علایم بافتی تخدمان می‌گردد، بنابراین می‌توان احتمال داد که کورکومین نیز مانند متغورمین (به عنوان یکی از داروهای موثر در کاهش علایم این سندروم) بتواند با کاهش میزان هورمون LH سبب القای تخمک‌گذاری و تعدیل علایم بافتی تخدمان شود. گفته شده است که از کورکومین می‌توان به عنوان یک ماده آنتی اکسیدانی قوی در برابر استرس‌های اکسیداتیوی و اثرات ناشی از آن استفاده کرد [۲۲]. کورکومین فعالیت‌های آنتی اکسیدانی را به شیوه‌ی مستقیم و غیر مستقیم توسط مهار اکسیژن واکنشی و القای پاسخ آنتی اکسیدانی انجام می‌دهد. اثر حفاظتی کورکومین بر کلیه در چندین مدل تجربی از جمله نفropاتی دیابتی، نارسایی مژمن کلیه، ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون و سمیت کلیوی ناشی از ترکیباتی مانند جنتاما-پسین، کلروکین، سدیم فلوراید و سیس پلاتین ارزیابی شد. نشان داده شده است که کورکومین یک مولکول محافظ کلیه در برابر استرس اکسیداتیو کلیوی است [۲۳]. کورکومین افزایش فعالیت آنزیم‌های آسپارتات ترانس آمیناز و آلkalین فسفاتاز که بر اثر التهاب کبد در حیواناتی که دچار آسیب کبدی ناشی از الكل هستند را مهار می‌کند [۲۴]. هم‌چنین، مشخص شده است که کورکومین به علت ویژگی‌های آنتی اکسیدانی اش باعث حفاظت حیوانات مورد آزمایش در مقابل ایسکمی می‌شود [۲۵]. با توجه به این تحقیقات مبنی بر خواص آنتی اکسیدانی کورکومین در بافت‌های کلیه و کبد، در این تحقیق از اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین در بهبود علائم این سندروم در تخدمان استفاده شد. با توجه به نقش اثبات شده‌ی استرس اکسیداتیو در ایجاد و تشید

Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 2007; 7(6): 597-603.

- [2] Marx TL, Mehta AE. Polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleve Clin J Med* 2003; 70(1): 31-45.
- [3] Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 2004; 60(1): 1-17.
- [4] Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, et al. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod* 2001; 64(1): 157-62.
- [5] Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 71(10): 1397-421.
- [6] Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 227-43.
- [7] Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 197-12.
- [8] Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 2007; 8(3): 443-9.
- [9] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin, a short review. *Life Sci* 2006; 78(18): 2081-7.
- [10] Blumenthal M, Goldberg A, Brinkman J. HerbalMedicine: The expanded commission E monographs. In: Newton MA, editor: Integrative Medicine Communications; 2000. pp. 330-4
- [11] Jurenka JS. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 2009; 14(2): 141-53.
- [12] Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005; 15(1): 24-27.
- [13] Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med* 2004; 14(2): 207-15.
- [14] Kohli K, Ali J, Ansari MJ, Raheman Z. Curcumin: A natural antiinflammatory agent natural antiinflammatory agent natural antiinflammatory agent. *Indian J Pharmacol* 2005; 37 (3): 141-147.
- [15] Desjardins GC, Beaudent A, Brawer JR. alternation in opioid parameters in the hypothalamus of rat with estradiol-induced polycystic ovarian disease. *Endocrinology* 1990; 127(6): 2669-76.
- [16] Karimzadeh L, Nabiuni M, Mohseni Kouchesfahani H, Adham H, Bagheri A, Sheikholeslami A. Effect of bee venom on IL-6, COX-2 and VEGF levels in polycystic ovarian syndrome induced in Wistar rats by estradiol valerate. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2013; 19(1): 32.
- [17] Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor Necrosis Factor-a Stimulates Proliferation of Rat Ovarian Theca- Interstitial Cells. *Biol Reprod* 2000; 61(4): 993-8.
- [18] Loucks AB, Thuma JR. Luteinizing hormone pullstility is disrupted at a threshold of energy availability in regularly menstruating women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(1): 97-311.
- [19] Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Reproduction* 2012; 86(5):149, 1-12.
- [20] Kazerooni T, Dehghan-Kooshkhyazi M. Effects of metformin therapy on hyperandrogenism in women with polycystic ovariane syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17(1): 51-96.
- [21] Miller M, Chen S, Woodliff J, Kansra S. Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Cell Proliferation, Induces Apoptosis, and Decreases Hormone Levels and Secretion in Pituitary Tumor Cells. *Endocrinology* 2008; 149(8): 4158-67.
- [22] Shang YJ, Jin XJ, Shang XL, Tang JJ, Liu GY, Dai F, et al. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure-activity relationship and influence of microenvironment. *Food Chem* 2010; 119(4): 1435-42.
- [23] Trujillo J, Chirino YI, Eduardo Molina-Jijón E, Ana Cristina A, Romero A, Tapia E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 2013; 1(1): 448-56.
- [24] Rajakrishnan V, Jayadeep A, Arun OS, Sudhakaran PR, Menon VP. Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity, effect of Curcumin and N-acetylcysteine. *J Nutr Biochem* 2000; 11(10): 509-14.
- [25] Ghoneim AI, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Denshary ES. Protective effects of Curcumin against ischeamia/reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacol Res* 2002; 46(3): 272-9.
- [26] Zhang D, Luo WY, Liao H, Wang CF, Sun Y. The effects of oxidative stress to PCOS. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008; 39(3): 421-3.
- [27] Karabulut AB, Cakmak M, Kiran RT, Sahin I. Oxidative Stress Status, Metabolic Profile and Cardiovascular Risk Factors in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. Oxidative Stress in PCOS. *Med Sci* 2012; 1(1): 27-34.
- [28] Banerjee M , Tripathi LM, Srivastava VM, Puri A, Shukla R. Modulation of inflammatory Mediators by ibuprofen and Curumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2005; 25(2): 213-24.
- [29] Li YC, Wang FM, Pan Y, Qiang LQ, Cheng G, Zhang WY, et al. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33 (3): 435-49.