

اثر سیلیمارین بر سندرم تخمدان پلی کیستیک القا شده توسط استرادیول ولرات

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

^۱ دانشیار، دکترای زیست شناسی سلولی و تکوینی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و تکوینی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)
^۳ کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و تکوینی، مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)

چکیده

سابقه و هدف: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) شایع‌ترین دلیل نازایی و اختلال اندوکروینی در زنان به دلیل عدم تخمک گذاری است. سیلیمارین دارای خاصیت ضدالتهابی و تعدیل کننده سیستم ایمنی می باشد. در این مطالعه، اثر سیلیمارین بر رت‌های مبتلا به PCOS مطالعه گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۴۴ سر رت ویستار ماده بالغ به گروه‌های کنترل، شاهد، PCOS و تیمار شده با سیلیمارین تقسیم شدند. القای سندرم در طول مدت ۶۰ روز به واسطه تزریق تک مرحله‌ای و زیر پوستی ۲ میلی گرم استرادیول ولرات به هر رت صورت گرفت. پس از القای سندرم، سیلیمارین به میزان ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ به صورت درون صفاقی تزریق گردید. گروه شاهد DMSO و کنترل هیچ تزریقی دریافت نکرد. پس از ده روز تزریق سیلیمارین، رت‌ها کشته و سرم و تخمدان نمونه‌ها به منظور بررسی تغییرات هیستولوژیک و سرلوژیک جمع‌آوری شد و با استفاده از روش ANOVA یک طرفه نرم افزار Instat آزمون شدند و $P < 0.05$ سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: القای PCOS سبب ایجاد کیست‌های فولیکولی، تکوین غیرطبیعی فولیکول‌ها و افزایش سطح اندروژن‌ها نسبت به گروه کنترل شد. سیلیمارین سبب کاهش تعداد کیست‌ها و ضخامت غلاف فولیکولی و همچنین موجب تعدیل سطح هورمون‌ها و تکوین فولیکول‌ها در رت‌ها نسبت به گروه PCOS شد.

نتیجه‌گیری: سیلیمارین می‌تواند علائم بافتی و هورمونی PCOS را که منجر به کاهش میزان تخمک گذاری می‌شود، کاهش دهد و اثر حفاظت‌کنندگی بر بافت تخمدان داشته باشد. احتمال می‌رود این توانایی به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سیلیمارین باشد که سبب کاهش تعداد کیست‌ها و تکوین طبیعی فولیکول‌ها می‌گردد.

واژگان کلیدی: استرادیول، جسم زرد، تخمدان پلی کیستیک، سیلیمارین.

مقدمه

۴۵ ساله) به آن مبتلا می‌شوند (۲،۱). این سندرم اولین بار در سال ۱۹۳۵ توسط اشتین و لونتال توصیف شد که تنها با چهار علامت الیگومنوره و آمنوره، ناباروری، هیرسوتیسم و چاقی مشخص می‌شد (۴،۳). اما بر اساس یک تعریف جدید معیارهای تشخیصی شامل هیپرآندروژنیسم و عدم تخمک گذاری مزمن می‌باشد (۵). سندرم تخمدان پلی کیستیک شایع‌ترین علت افزایش آندروژن‌ها و هیرسوتیسم می‌باشد. در بیش از ۵۰٪ بیماران مبتلا به این سندرم چاقی وجود دارد،

یکی از اختلالات شایع غدد آندوکروین در زنان، سندرم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovarian Syndrome) است که در حدود ۶ تا ۱۰ درصد از زنان سنین باروری (۱۵ تا

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، محمد نبیونی (email: devbiokharazmi@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۷/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۳

مهار فعالیت تیروزین کیناز می‌شود. مقاومت به انسولین حاصل از فعالیت NF-KB یکی از علل ایجاد کیست‌های تخمدانی به علت تغییر در فعالیت LH است، بدین ترتیب دانشمندان با افزایش میزان گلوکز رژیم غذایی سبب افزایش التهاب و پیشرفت PCOS شدند (۱۱).

سیلیمارین (silymarin) مخلوطی فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم (SilybumMarianum) به دست می‌آید. خارمریم (Milk Thistle) از خانواده کاسنی است و اصالتاً بومی منطقه مدیترانه است. این گیاه امروزه در سرتاسر نقاط دنیا از اروپا تا آسیا و از آفریقا تا آمریکای شمالی گسترده شده است. در ایران، این گیاه به طور خودرو در کنار جاده‌های متروک اراضی بایر در مناطق شمال غرب و جنوب یافت می‌شود (۱۲).

سیلیمارین دارای خاصیت ضدالتهابی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی است و از طریق مهار فاکتور درپیش‌گیری از التهاب موثر kB (NF-kB) هسته‌ای موثر است و به عبارت دیگر یک مهارکننده قوی فعال‌سازی NF-kB در پاسخ به TNF- α است. این اثر از طریق مهار فسفریلاسیون و تخریب IKBa که یک مهارکننده NF-kB می‌باشد، صورت می‌گیرد (۱۳).

خواص ضداکسیدانی سیلیمارین نیز در مطالعات متعددی نشان داده شده است. سیلیمارین (با استفاده از خاصیت آنتی‌اکسیدانی) با افزایش گلوکوتائون سلولی به مسمومیت‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد بدن کمک می‌کند و از پراکسیداسیون لیپیدها که باعث آسیب غشای سلولی می‌شود، جلوگیری میکند (۱۳، ۱۴).

با توجه به خواص ضدالتهابی و ضداکسیدانی سیلیمارین، در این مطالعه اثرات سیلیمارین در کاهش علائم التهابی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بررسی گردید.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از ۱۴۴ سر رت نژاد ویستار ماده با وزن 160 ± 20 گرم استفاده گردید که در قفس‌های مخصوص با فضای استاندارد و تحت شرایط محیطی مناسب و درجه حرارت مطلوب ۲۴-۲۰ درجه سانتیگراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزادانه به غذا و آب در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی نگهداری شدند. برای اجرای این تحقیق، رت‌هایی انتخاب شدند که دارای دو تا سه دوره استروس منظم در طی دوازده تا چهارده روز مشاهده اسمیر واژینال بوده و در مرحله استروس سیکل تولیدمثلی خود قرارداشتند. برای القاء فنوتیپ سندرم

چربی بدن معمولاً به شکل مرکزی (چاقی آندروئیدی) تجمع یافته و افزایش نسبت دور کمر به دور باسن سبب افزایش خطر دیابت شیرین و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود (۶).

همچنین باعث اختلالات هیستولوژیک مانند بزرگی دوطرفه تخمدان، حضور تعداد بیش از ۱۲ فولیکول با سایز کمتر از ۱۰ میلیمتر اطراف استرومای متراکم مرکزی، افزایش ضخامت غلاف فولیکولی و استرومای تخمدانی به دلیل افزایش آنژیوژنز، واسکولوژنز و جریان خون تخمدانی و متعاقباً کاهش یا عدم تخمک‌گذاری مزمن و ناباروری نیز می‌گردد (۷).

از دلایل بروز PCOS می‌توان به نقص در عملکرد هیپوتالاموس-هیپوفیز، عملکرد تخمدان و فعالیت انسولین اشاره کرد. در واقع PCOS با ترشحات غیرعادی گنادوتروپینها، افزایش ساخت استروئیدها در تخمدان و برخی اوقات مقاومت به انسولین همراه می‌باشد (۸). میزان هورمون LH به طور ویژه در زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد که به دلیل افزایش در میزان و تناوب ترشح این هورمون است. زمانی که غلظت هورمون LH نسبت به FSH افزایش پیدا کند، تخمدان‌ها به طور ترجیحی سنتز آندروژن‌ها را افزایش می‌دهند. میزان انسولین و فاکتورهای شبه‌انسولینی (IGFs) نیز در زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد که موجب افزایش سنتز آندروژن در سلول‌های غلاف فولیکولی و در نتیجه تقویت عملکرد LH خواهد شد (۹).

نشان داده شده که انسولین و IGF-1 و IGF-2 از جمله تنظیم‌کنندگان اتوکراین و پاراکراین سلول‌های T-I (Theca بینابینی) در انسان و رت هستند و قادرند تکثیر و فعالیت استروئیدوژنز این سلول‌ها را تحریک نمایند. عملکرد و مورفولوژی غیرطبیعی این سلول‌ها در مقاومت به انسولین و هایپرانسولینمیا و افزایش IGF-1 و پاتوژنز PCOS نقش دارد. همچنین میزان سرمی فاکتور نکرور دهنده تومور الفا (TNF- α) و افزایش بیان آن در بافت‌های چربی در انسان و جوندگان پلی‌کیستیک، نقش آن را در تنظیم فعالیت‌های طبیعی تخمدان سالم نشان می‌دهد (۱۰).

شواهدی مبنی بر رابطه مستقیم و نزدیک بین التهاب سیستمیک و موضعی و PCOS وجود دارد. نشان داده شده که هایپرگلیسمی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون این بیماران می‌گردد. ROS سبب القای استرس اکسیداتیو در سلول‌ها شده و با فعال نمودن مسیر NF-KB سبب افزایش رونویسی TNF- α و مقاومت به انسولین می‌گردد. TNF- α موجب القای فسفرولاسیون سرین سوستریت-۱ رسپتور انسولین و سپس

حاوی نمونه خون در بن ماری با دمای ۳۷ قرار گرفت. پس از بسته شدن رشته‌های فیبرین موجود در خون، با استفاده از سانتریفیوژ سه هزار دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سرم نمونه‌های خونی جدا شده و تا زمان انجام آزمایشات سِرولوژیک به روش CLIA (Chemiluminescence Immunoassay) به منظور بررسی تغییرات میزان سرمی استرادیول، تستوسترون، پروژسترون، FSH و LH در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تحلیل آماری داده‌ها، از آزمون one-way ANOVA و نرم افزار INSTAT version 3 استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی در رت‌ها، حیوانات دو گروه کنترل و القا شده با استرادیول ولرات را وزن کرده و تغییرات مشاهده شده را با هم مقایسه نمودیم. علاوه بر افزایش معنی‌دار در میزان وزن بدن ($P < 0.001$) در گروه القا شده نسبت به گروه کنترل، افزایش میزان چربی‌های محوطه شکمی به صورت ماکروسکوپی نیز مشاهده گردید. پس از تزریق درون صفاقی سیلیمارین به مدت ۱۴ روز نشان داده شد که وزن بدن کاهش ($P < 0.01$) چشمگیری داشته و چربی‌های محوطه شکمی نیز کاهش یافته بود (شکل ۱ و جدول ۱). در این بررسی تفاوت معنی‌داری میان نتایج حاصل از گروه کنترل و گروه شم مشاهده نشد. بدین منظور داده‌های مربوط به گروه شم حذف گردید.

جدول ۱. وزن تخمدان و وزن بدن رت‌های گروه کنترل، گروه PCOS و گروه تیمار شده با سیلیمارین

گروه کنترل	گروه PCOS	گروه PCOS+SLM
وزن بدن (g) $160 \pm 6/57$	$227/5 \pm 6/67^{\dagger}$	$180/55 \pm 6/72^*$
وزن تخمدان (mg) $12/7 \pm 0/3$	$21 \pm 0/39^{\dagger}$	$15 \pm 0/23^*$

* $P < 0.01$; $^{\dagger}P < 0.001$; PCOS: Polycystic ovarian syndrome; SLM: Silymarin

پس از کشتن رت‌ها با کلروفرم و خون‌گیری و برش دادن پوست ناحیه شکمی و صفاق، اقدام به خارج کردن تخمدان‌ها و جدا نمودن چربی‌های زاید و لوله‌های اوویداکت از آن نموده و سپس تخمدان‌ها را با ترازوی حساس وزن کردیم. نشان داده شد میانگین وزن تخمدان در گروه تجربی حدود ۲۱ میلی‌گرم بود که نسبت به گروه

تخمدان پلی کیستیک روش‌های القا هورمونی و غیرهورمونی متنوعی از جمله هورمون تستوسترون، استرادیول ولرات (EV)، دهیدرواپی‌اندروسترون (DHA)، آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) و استفاده از نور طولانی مدت وجود دارد (۶). در این تحقیق از روش القاء هورمونی با استرادیول ولرات (داروسازی ابوریحان-ایران) به رت‌های انتخاب شده با معیارهای مذکور استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا محل تزریق را با الکل ۷۰ درصد استریل گردید و دوز دو میلی‌گرم استرادیول ولرات به صورت زیرپوستی تزریق شد. به رت‌های گروه شم به همان میزان روغن کنجد به عنوان حلال استرادیول تزریق گردید. گروه شم و گروه تجربی به مدت ۶۰ روز پس از تزریق روغن کنجد و استرادیول ولرات تحت بررسی‌های اسمیر واژینال قرار گرفتند تا نامنظم شدن سیکل استروس و وقوع فاز اسمیر واژینال شاخی پایدار (PVC: Persistent Vaginal Cornification) که یکی از علایم وجود کیست‌های فولیکولی در تخمدان است، بررسی و مشاهده شود.

همچنین به منظور تاییدیه دیگری برای القای سندرم تخمدان پلی کیستیک، سه سر از رت‌ها را با تنفس کلروفرم کشته و با بررسی‌های هیستولوژیک و سرولوژیک القای رت‌ها نسبت به گروه کنترل تایید گردید. سپس رت‌های EV به دو گروه شاهد و تحت تیمار تقسیم شدند. موش‌های تیمار روزانه تحت تزریق درون صفاقی سیلیمارین به میزان ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان قرار گرفتند. به گروه شم مربوط به این گروه حلال سیلیمارین یعنی DMSO (Dimethyl sulfoxide) تزریق شد. پس از ۱۴ روز متوالی تیمار با سیلیمارین رت‌ها را با تنفس کلروفرم کشته و نمونه‌های تخمدانی جدا شد. تخمدان‌ها پس از خارج شدن از بدن موش و حذف بافت‌های اضافی در محلول بوئن الکلی فیکس شدند. پس از قالب‌گیری، به صورت سریالی و با ضخامت ۶-۷ میکرومتر برش داده شدند و برش‌ها بر روی لام‌های پوشیده شده با ژلاتین قرار گرفتند. به منظور بررسی هیستولوژی، برش‌ها پس از پارافین‌زدایی و آب‌دهی توسط محلول‌های الکل با درجات نزولی، باهماتوکسیلین رنگ آمیزی شده و سپس با ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تعیین میزان بهبود تخمدان‌های پلی کیستیک، علاوه بر بررسی‌های هیستومورفومتریک، خون رت‌ها مورد بررسی سرولوژیک نیز قرار گرفت. برای این کار، با استفاده از سرنگ دو میلی‌لیتر خون‌گیری از قلب حیوانات انجام شد. لوله‌های

جدول ۲. میانگین (\pm انحراف معیار) غلظت‌های هورمونی پروژسترون، تستوسترون، استرادیول، FSH و LH در گروه‌های تیمار، کنترل مثبت و PCOS

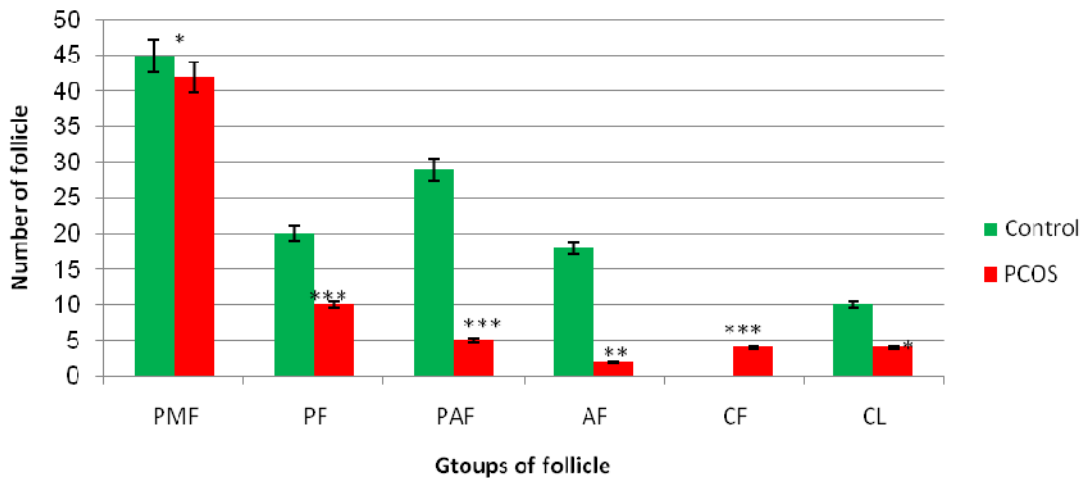
گروه‌ها	P4 (ng/ml)	T (ng/ml)	E2 (ng/ml)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
PCOS	۲۹/۳۸ \pm ۰/۵	۰/۹۶ \pm ۰/۰۱	۰/۰۵۲ \pm ۰/۰۰۳	۶۱۷ \pm ۹۹	۵/۵۶۵ \pm ۰/۲۴۵
Cont	۷۱/۰۳۵ \pm ۲/۷۰۵	۰/۶۵ \pm ۰/۰۴	۰/۰۲۹ \pm ۰/۰۰۱	۲۶۴۰/۲۹ \pm ۵۵/۶۶	۳ \pm ۰/۱۵
PCOS+dose20	۳۱/۵۵۵ \pm ۰/۴۷۵	۰/۸۸۵ \pm ۰/۰۱۵	۰/۰۴۹ \pm ۰/۰۰۱	۷۲۳/۸۳ \pm ۲۰۵/۷۱	۴/۰۹۵ \pm ۰/۱۵۵
PCOS+dose50	۳۳/۵۸۵ \pm ۰/۴۳۵	۰/۸۲ \pm ۰/۰۰۲*	۰/۰۴ \pm ۰/۰۰۲*	۹۱۰۹۵/۱۱۵/۲۴	۳/۸۳۵ \pm ۰/۰۴۵
PCOS+dose100	۴۸/۷۵ \pm ۰/۲۵*	۰/۷۶ \pm ۰/۰۰۲†	۰/۰۳۲ \pm ۰/۰۰۱†	۱۳۱۲/۶۵۵ \pm ۵۴/۹*	۲/۸۸۵ \pm ۰/۰۸۵*
PCOS+dose200	۵۳ \pm ۰/۳۲†	۰/۶۹۵ \pm ۰/۰۰۵†	۰/۰۲۸ \pm ۰/۰۰۱†	۱۵۸۴/۲۳ \pm ۱۵/۷۲†	۲/۷۱ \pm ۰/۰۹*
PCOS+dose300	۶۰/۵۳ \pm ۰/۵۸*	۰/۶۲ \pm ۰/۰۰۲*	۰/۰۲۵ \pm ۰/۰۰۱*	۱۷۷/۴ \pm ۲۲۸۰/۶۵*	۲/۶۷۵ \pm ۰/۲۵۵†

* p<۰/۰۰۱†؛ p<۰/۰۱؛ p<۰/۰۰۵

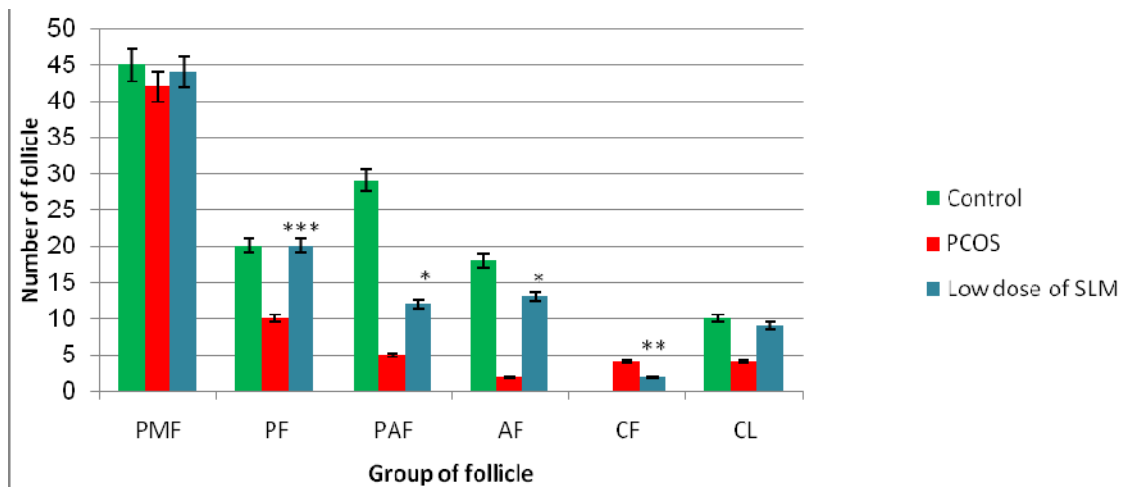
FSH و پروژسترون شد که به دلیل ظهور اجسام زرد در این گروه از تخمدان‌ها بود (جدول ۲).
به منظور تعیین تغییرات تکوین فولیکولی، فولیکول‌ها بر اساس ریخت‌شناسی و قطر انواع فولیکول‌ها به شش گروه دسته‌بندی شدند که شامل فولیکول‌های بدوی، فولیکول‌های اولیه، فولیکول‌های پیش‌آنترال، فولیکول‌های آنترال، فولیکول‌های کیستیک و اجسام زرد می‌باشند. پس از پایان ۶۰ روز در تخمدان‌های تیمار شده با EV در رت‌های بالغ تعداد زیادی فولیکول‌های کوچک و فولیکول‌های بزرگ کیستیک مشاهده شد که اینها از مشخصه PCOS است، همچنین در این گروه جسم زردی مشاهده نشد. در گروه شاهد بر خلاف گروه تیمار، تخمدان‌ها فاقد کیست و دارای جسم زرد فراوان بودند که نشان دهنده تخمک‌گذاری طبیعی در این گروه می‌باشد (شکل ۲). بنابراین با توجه به مشاهدات ما، تیمار با EV پس از ۶۰ روز منجر به ایجاد کیست و توقف رشد فولیکولی و در نتیجه عدم تخمک‌گذاری می‌گردد.

پس از تیمار تخمدان‌های پلی‌کیستیک با سیلیمارین، بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که تعداد کیست‌ها و اندازه آنها کاهش یافته است، در دوزهای بالای تزریق سیلیمارین (۳۰۰ mg/kg) تقریباً هیچ کیستی یافت نشد (شکل ۲ و نمودار ۲ و ۳). همچنین تعدادی جسم زرد در اکثر آنها مشاهده شد که نشان دهنده انجام و آغاز تخمک‌گذاری در آنها می‌باشد (شکل ۲).

کنترل افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) را نشان داد، این در حالی بود که میانگین وزن تخمدان در نمونه‌های تیمار شده تقریباً تا حد کنترل کاهش ($P<۰/۰۱$) نشان داد که شاید به دلیل افزایش مایع فولیکولی و افزایش میزان هورمون LH باشد (جدول ۱). افزایش میزان مایع فولیکولی و استروما است که باعث افزایش وزن تخمدان در تخمدان‌های پلی‌کیستیک می‌شود. پس از نمونه‌گیری خونی به صورت مستقیم از قلب حیوانات هم‌گروه‌ها، سرم خون جمع‌آوری شد و جهت بررسی‌های هورمونی دردمای ۲۰-نگه‌داری شد. نتایج حاصل از CLIA نشان داد که میزان تستوسترون، استرادیول و LH در گروه تجربی به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت و میزان هورمون‌های پروژسترون و FSH به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش نشان داد (جدول ۲). این نتایج بیان داشت که در نتیجه القای سندرم فوق‌میزان هورمون‌های استرادیول و تستوسترون و LH دچار تغییرات بحرانی شده و به این ترتیب افزایش معنی‌دار میزان آندروژن‌ها و متعاقب آن میزان استروژن‌ها سبب بروز علائم مورفولوژیک مشاهده شده سندرم در این تحقیق و تغییرات گزارش شده قبلی در سیستم‌های متابولیک شد. در این تحقیق با تجویز دوزهای مختلف سیلیمارین به رت‌های PCOS شده در طی ۱۴ روز متوالی به نتایج مثبتی دست یافتیم، دوزهای مختلف سیلیمارین باعث کاهش معنی‌داری در استرادیول، تستوسترون و LH و افزایش معنی‌داری در هورمون‌های



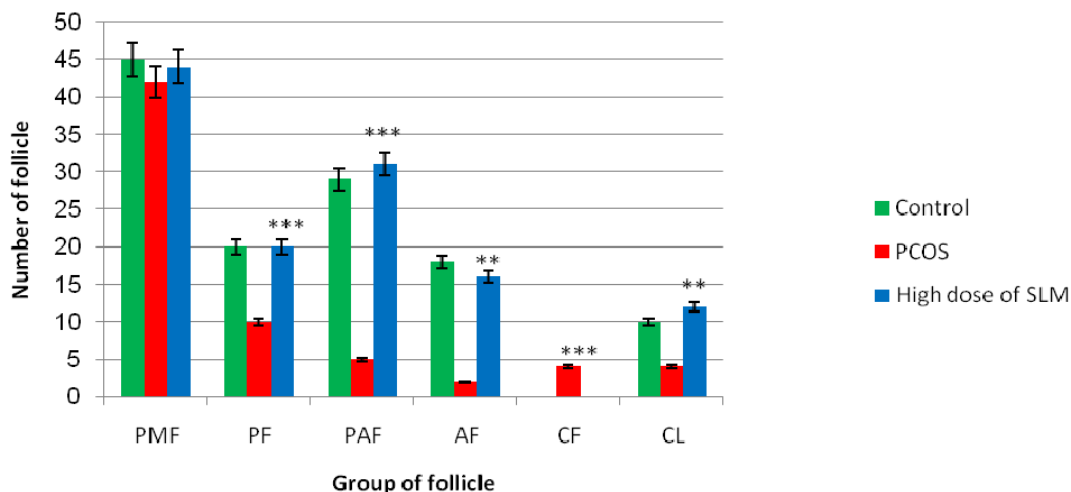
نمودار ۱. مورفومتری گروه‌های مختلف فولیکولی در تخمدان‌های گروه کنترل و گروه تخمدان پلی کیستیک. در تخمدان گروه‌های پلی-کیستیک افزایش معنی‌داری در تعداد کیست‌ها و کاهش معنی‌داری در تعداد جسم زرد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$ ، $^{**}P < 0.01$ ، $^{***}P < 0.001$). PMF = فولیکول‌های بدوی. PF = فولیکول اولیه. PAF = فولیکول پره‌آنترال. AF = فولیکول آنترال. CF = فولیکول کیستیک. CL = جسم زرد.



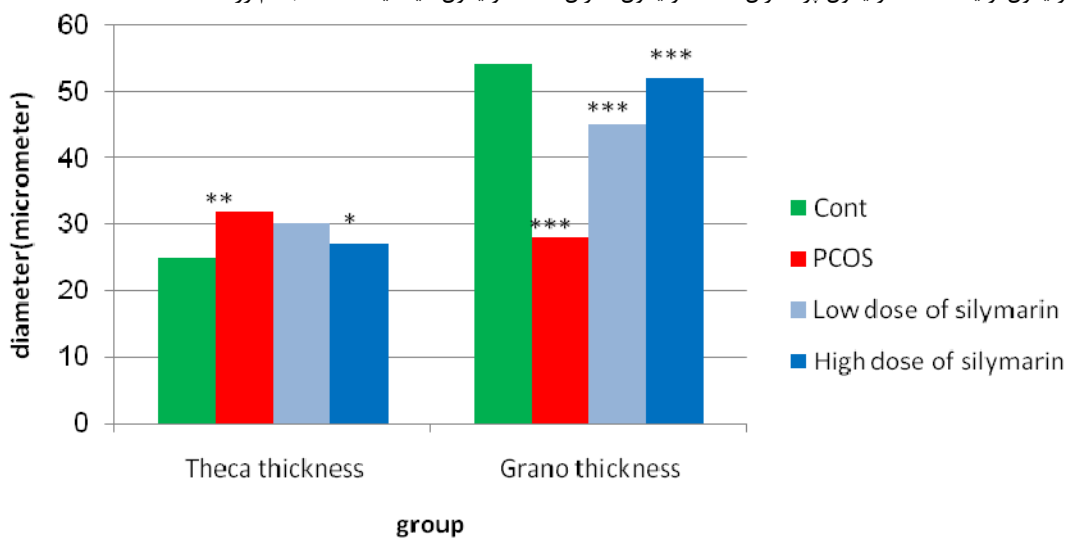
نمودار ۲. مورفومتری گروه‌های مختلف فولیکولی در تخمدان‌های گروه کنترل، گروه پلی کیستیک و گروه پلی کیستیک تیمار شده با دوز پایین سیلیمارین (n=10 در هر گروه). در تخمدان گروه‌های پلی کیستیک تیمار شده با سیلیمارین افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌ها (به جز فولیکول‌های بدوی) نسبت به گروه پلی کیستیک مشاهده شد. ضمناً کاهش معنی‌داری در تعداد کیست‌های تخمدانی مشاهده شد ($P < 0.05$ ، $^{*}P < 0.01$ ، $^{**}P < 0.001$). PMF = فولیکول بدوی. PF = فولیکول اولیه. PAF = فولیکول پره‌آنترال. AF = فولیکول آنترال. CF = فولیکول کیستیک. CL = جسم زرد.

حیوانات بوده است. اندازه‌گیری لایه غلاف فولیکولی در گروه تیمار شده با سیلیمارین به وسیله اکولر مدرج انجام گرفت و نتایج حاصل با گروه کنترل بیمار و کنترل سالم مقایسه شدند. این مقایسه نشان داد که سیلیمارین سبب کاهش معنی‌داری در ضخامت این لایه در تخمدان حیوانات شده و موجب آزادی کمپلکس اووسیت- کومولوس را در فولیکول‌های پیش اووله

همچنین به منظور بررسی‌های مورفومتریک لایه سلولی غلاف فولیکولی در گروه‌های مختلف تحت بررسی از اکولر مدرج و ابژکتیو چشمی ۱۰ و ۴۰ میکروسکوپ نوری استفاده گردید. اندازه‌گیری ضخامت لایه غلاف فولیکولی در گروه کنترل بیمار طبق گزارشات قبلی و تحقیق حاضر افزایش معنی‌داری را نشان داد که خود حاکی از القای PCOS در این گروه از



نمودار ۳. مورفومتری گروه‌های مختلف فولیکولی در تخمدان‌های کنترل، گروه پلی‌کیستیک و گروه پلی‌کیستیک تیمار شده با دوز بالای سیلیمارین ($n=10$ در هر گروه). در تخمدان گروه‌های پلی‌کیستیک تیمار شده با سیلیمارین افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌ها (به جز فولیکول‌های بدوی) نسبت به گروه پلی‌کیستیک مشاهده شد. در ضمن کاهش معنی‌داری در تعداد کیست‌های تخمدانی نسبت به گروه تخمدان پلی‌کیستیک مشاهده شد ($P<0.05$ ، $P<0.01$ ، $P<0.001$). PMF = فولیکول بدوی. PF = فولیکول اولیه. PAF = فولیکول پره‌آنترال. AF = فولیکول آنترال. CF = فولیکول کیستیک. CL = جسم زرد.



نمودار ۴. مورفومتری ضخامت لایه گرانولوزا و لایه غلاف فولیکولی در تخمدان کنترل، پلی‌کیستیک و پلی‌کیستیک تیمار شده با غلظت‌های بالا و پایین سیلیمارین. ضخامت لایه‌های غلاف فولیکولی و گرانولوزا در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. گروه تیمار شده با غلظت‌های بالا و پایین سیلیمارین در افزایش معنی‌دار لایه گرانولوزا موثر واقع شده است، در حالی که تنها در غلظت‌های بالا موجب کاهش معنی‌دار در ضخامت لایه غلاف فولیکولی شده است ($n=10$ ، میانگین \pm انحراف معیار). ($P<0.05$ ، $P<0.01$ ، $P<0.001$).

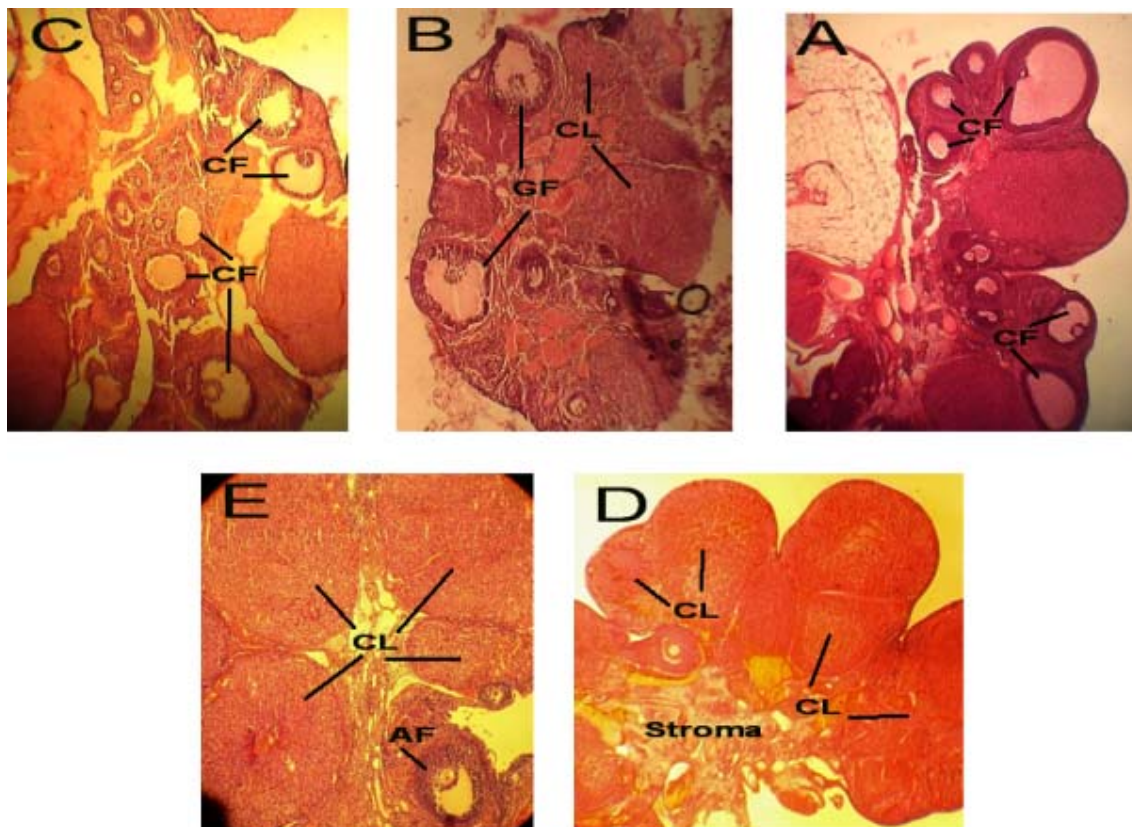
بحث

در تحقیق حاضر، تاثیر سیلیمارین به عنوان ماده موثره حاصل از گیاه خار مریم که دارای ترکیبات فلاونوییدی با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد به عنوان یک عامل ضدالتهابی و بر بهبود

فراهم آورده است که احتمالاً به دلیل خاصیت ضدالتهابی سیلیمارین است که باعث کاهش التهاب و کاهش کلاژن در غلاف فولیکولی و در نهایت کاهش ضخامت این لایه می‌شود (نمودار ۴).



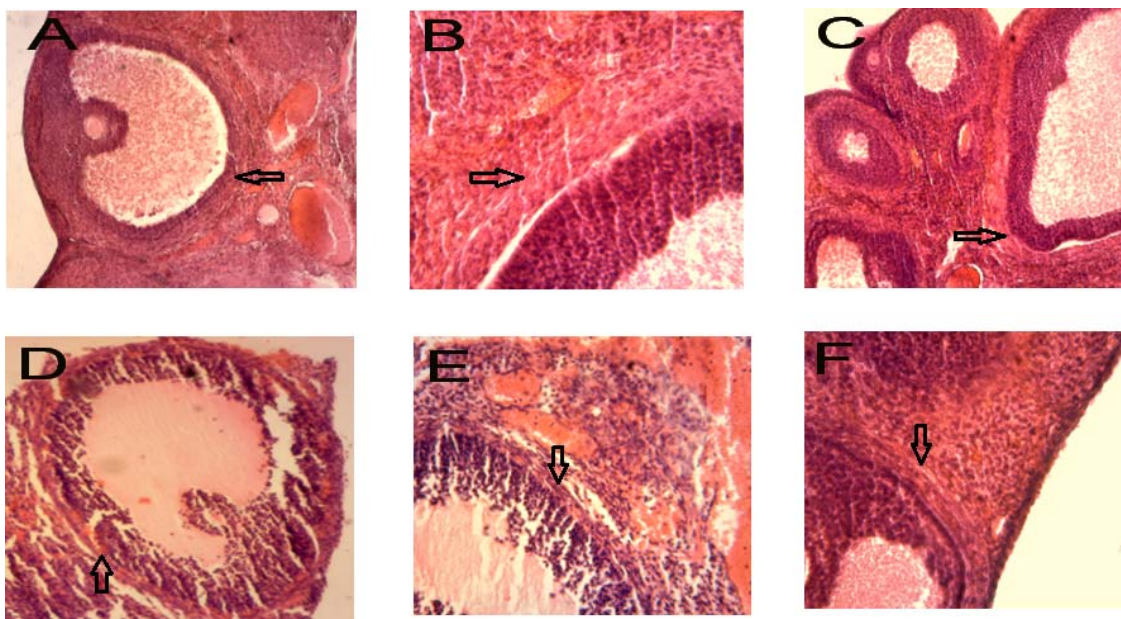
شکل ۱. شکل A: تخمدان سالم که دارای فولیکول‌های فعال و در نتیجه به رنگ قرمز است. شکل B: نمونه PCOS که در آن رنگ تخمدان به دلیل فقدان فولیکول‌های فعال، سفید است، چربی‌ها در اطراف تخمدان و شاخ‌های رحمی و همچنین اطراف کلیه‌ها تجمع پیدا کرده‌اند. شکل C: تخمدان PCOS تیمار شده با دوز بالای سیلیمارین که حجم کمتری از چربی‌های ناحیه شکمی را نسبت به نمونه PCOS نشان می‌دهد. تیمار تخمدان‌ها با سیلیمارین منجر به تولید فولیکول‌های بالغ و فعال شد.



شکل ۲. آنالیز هیستولوژیک تخمدان القا شده با استرادیول ولرات (PCOS) در مقایسه با تخمدان سالم و تیمار شده با سیلیمارین. برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین. تخمدان پلی کیستیک (A) دارای تعداد زیادی فولیکول کیستیک بزرگ همراه با لایه گرانولوزا نازک و غلاف فولیکولی ضخیم می‌باشد. تخمدان تیمار شده با دوز پایین سیلیمارین (C) که دارای فولیکول‌های کیستیک کوچکتر و کمتر است. تخمدان تیمار شده با دوز بالای سیلیمارین (۳۰۰ mg/kg) (B) که دارای فولیکول‌های گراف بزرگ با غلاف فولیکولی نازک می‌باشد که نشانه‌ی تخمک‌گذاری نرمال می‌باشد. شکل D تخمدان سالم و شکل E تیمار شده را نشان می‌دهد. (CL (Corpus luteum), GF (Graafian follicle), AF (Antral follicle)). (بزرگنمایی (A,B,C,D: x40) (بزرگنمایی E: x100)

Spritzer و همکاران در مطالعه‌ای که انجام دادند دریافتند که کاهش پایه و یا پاسخ تحریک شده هورمون لوتئینی در

علائم تخمدان پلی کیستیک القا شده با استرادیول ولرات بررسی شد.



شکل ۳. آنالیز هیستولوژیک تخمدان القاء شده با استرادیول ولرات (PCOS) در مقایسه با تخمدان تیمار شده با سیلیمارین. برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و اتوزین. برش‌های A و B و C لایه‌های ضخیم غلاف فولیکولی و لایه نازک گرانولوزا را در تخمدان پلی‌کیستیک نشان می‌دهند. شکل‌های D و E و F همین لایه‌ها را در تخمدان تیمار شده با سیلیمارین را نشان می‌دهد. (بزرگنمایی (A,C,D: x40) (B,E,F: x100)

گسترش و تثبیت کیست‌ها شوند. در بررسی حاضر نیز افزایش این سری از فولیکول‌ها مشاهده شد که موید بررسی Welschen می‌باشد و چنانچه این دلیلی برای وجود کیست‌ها تلقی شود، بنابراین می‌توان گفت کاهش معنی‌دار LH در گروه تیمار در مقایسه با گروه PCOS و در نتیجه کاهش تعداد این فولیکول‌ها توسط سیلیمارین یکی از عوامل مهم در کاهش کیست‌ها و بهبود علائم تخمدانی این سندرم است (۱۷).

غلظت‌های سرمی تستوسترون و آندروستندیون در زنان مبتلا به PCOS نسبت به زنان طبیعی ۵۰ تا ۱۵۰٪ افزایش را نشان می‌دهد (۱۸). همچنین افزایش در تولیدپیش‌سازهای آندروژنی در سلول‌های غلاف فولیکولی منجر به افزایش تولید آندروستندیون می‌شود، که پس از آن توسط $\beta 17$ -هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ($\beta 17$) به فرم تستوسترون تبدیل می‌شود یا به وسیله آنزیم آروماتاز به فرم استرون ساخته می‌شود (۱۹). در این تحقیق، میزان هورمون تستوسترون در گروه تحت مطالعه در دوزهای بالاتر تزریق درون صفاقی سیلیمارین معنی‌دار بود ($p < 0.01$). احتمالاً سیلیمارین با اثرات ضد رگ‌زایی که در تحقیق نبیونی و همکاران به آن اشاره شده است باعث کاهش تکثیر و ضخامت لایه غلاف فولیکولی و در نتیجه کاهش تولید تستوسترون می‌شود (۷).

بیماران چاق مبتلا به PCOS ممکن است با مقاومت به لپتین مرتبط باشد و همچنین باعث افزایش ترشح هورمون لوئینی شود، به عبارت دیگر افزایش لپتین باعث افزایش LH می‌شود. در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نسبت LH/FSH نسبت به گروه کنترل بالا است و مقاومت به انسولین در این بیماران نسبت به گروه کنترل بیشتر است (۱۵). در این رابطه، Zafari و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تأثیر عصاره بابونه در تخمدان پلی‌کیستیک باعث می‌شود که میزان استرادیول و نسبت LH/FSH به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد و این کاهش سبب بهبود علائم این سندرم شد. در این بررسی نیز احتمال می‌رود کاهش علائم سندرم القا شده به ویژه در تخمدان‌ها، به دلیل کاهش میزان این هورمون‌ها در حیوانات تیمار شده با سیلیمارین باشد (۱۶).

Welschen نشان داد افزایش میزان LH برای مراحل نهایی رشد و نمو فولیکولی در رت‌های هیپوفیزکتومی شده بالغ که با PMSG (Pregnant mar's serum gonadotrophin) تیمار شده‌اند، مورد نیاز است. اما افزایش این هورمون به صورت یکنواخت مشکل اساسی بیماران مبتلا به این سندرم می‌باشد، چرا که آزادی تخمک‌نیازمند یک افزایش ناگهانی در میزان LH است. طبق بررسی‌های او، فولیکول‌های ثانویه که بین روزهای ۲۸ تا ۵۶ به وجود می‌آیند، باعث افزایش مداوم غلظت LH و

متفورمین می‌باشد که از طریق کاهش میزان گلوکز اعمال اثر می‌کند، در نتیجه می‌توان گفت سیلیمارین احتمالاً از همین مسیر موجب کاهش علائم این سندرم می‌گردد. چنانچه Baluchnejadmojarad و همکاران نشان دادند که به دلیل وجود ارتباط مستقیم میان میزان گلوکز خون گلیکاسیون پروتئینی ۲۶، تولید ROS و تخلیه گلوکوتائون، یکی از اثرهای کاهش گلوکز خون به وسیله سیلیمارین، کاهش استرس اکسیداتیو است (۲۳).

با توجه به نقش چشمگیر آنزیم سیکلوآکسیژناز ۲ (COX-2: Cyclooxygenase 2) در ایجاد التهاب در PCOS، در تحقیق حاضر نقش سیلیمارین به عنوان عامل ضدالتهاب نیز مورد توجه قرار گرفت (۲۴). چنانچه افزایش بیان آنزیم COX-2 در بافت‌های عروقی و اعصاب محیطی موجب افزایش تولید پروستاگلاندین ۲-PGE، افزایش فعالیت NF-κB، افزایش فعالیت لپواکسیژناز، اینترلوکین ۶-IL، فاکتور نکروز دهنده توموری (TNF-α) و ایجاد التهاب است (۷). از آنجا که سیلیمارین قادر به مهار آنزیم COX-2 و لپواکسیژناز است، به نظر می‌رسد که این ماده بتواند از این مسیر، التهاب را در سندرم تخمدان پلی کیستیک کاهش دهد (۲۲). همچنین Spaczynski بیان داشت افزایش لایه غلاف فولیکولی و نیز کاهش چشمگیر ضخامت لایه گرانولوزا در فولیکول‌های آنترال میانی و آنترال نهایی در این سندرم به دلیل تغییراتی بوده است که در بیان TNF-α به وجود آمده است و نتایج حاصل در این بررسی تاییدی است بر بررسی‌های Spaczynski که در سال ۱۹۹۹ صورت گرفته است (۱۰). احتمالاً سیلیمارین با کاهش بیان TNF-α و در نتیجه کاهش التهاب باعث کاهش ضخامت لایه غلاف فولیکولی و افزایش تخمک گذاری شده است.

نتایج هورمونی و هیستولوژیکی نشان داد که سیلیمارین به صورت وابسته به دوز می‌تواند نشانه‌های PCOS را کاهش دهد. به نظر می‌رسد این کاهش به دلیل اثرات آنتی اکسیداتیو ضدالتهابی سیلیمارین باشد، به عبارت دیگر سیلیمارین به ویژه در دوزهای بالا با اثرات آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی در رت‌های مبتلا به تخمدان پلی کیستیک باعث افزایش تعداد فولیکول‌های کوچک و کاهش لایه غلاف فولیکولی گردید. همچنین در بیشتر موارد تعدادی جسم زرد در تخمدان مشاهده شد که می‌تواند در بهبود کیست‌ها موثر واقع شود و باعث آغاز مجدد فرآیند اوولاسیون شود.

Doldi و همکاران نشان دادند که تولید پروژسترون و استرادیول سلول‌های گرانولوزای زنان مبتلا به PCOS نرمال نیست. این نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به PCOS پاسخ متفاوتی به گنادوتروپین‌ها نسبت به نمونه سالم نشان می‌دهند. آنها اظهار داشتند که غلظت‌های سرمی استرادیول و پروژسترون به ترتیب در نمونه PCOS کاهش و افزایش معنی داری نشان داده است. این تغییرات نیز در تحقیق حاضر هم راستا با تحقیقات وی مشاهده شد و تزریق درون صفاقی سیلیمارین به مدت ۱۴ روز موجب کاهش و افزایش معنی داری در میزان هورمون‌های استرادیول و پروژسترون گردید. احتمال می‌رود افزایش در میزان هورمون پروژسترون به دلیل افزایش جسم زرد در نمونه‌های تیمار شده با سیلیمارین باشد (۲۰).

کوچصفهانی و همکاران با تیمار تخمدان‌های PCOS رت به وسیله سم زنبور عسل نشان دادند که میزان فولیکول‌های اولیه و بدوی در آنها افزایش پیدا می‌کند. در پژوهش حاضر نشان داده شد به کارگیری دوزهای بالاتر سیلیمارین نیز می‌تواند به صورت معنی داری بر رشد و نمو فولیکولی موثر باشد و میزان انواع فولیکولی را افزایش دهد (۲۱). در واقع، تیمار تخمدان‌ها با سیلیمارین باعث افزایش معنی دار فولیکول‌های اولیه و بدوی شد که مطابق تحقیقات انجام شده توسط کوچصفهانی و همکاران است که می‌تواند به دلیل فعال شدن تخمدان باشد.

در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان یا استرپتوزوتوسین علاوه بر افزایش سطح گلوکز خون، سطوح کلسترول، تری گلیسیرید، C-HDL و VLDL-C سرم افزایش و سطح HDL-C کاهش می‌یابد. هیپرگلیسمی از طریق گلیکاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها و یا از طریق احیای گلوکز به سوربیتول به وسیله آنزیم آلدوز دوکتاز باعث القای استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنین، برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که در دیابت نوع II و I میان هیپرگلیسمی و مارکرهای پراکسیداسیون لیپیدی و سوپراکسید سرم ارتباط وجود دارد. در بیماری دیابت نوع I، استرس اکسیداتیو چند سال بعد از تشخیص دیابت و قبل از ایجاد عوارض به وجود می‌آید و با پیشرفت بیماری، میزان آنتی اکسیدان‌ها کاهش و تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد که این امر بستگی به میزان کنترل قند خون دارد. سیلیمارین با تأثیر بر کینتیک گلوکز ۶-فسفاتاز و مهار گلوکونوژنز موجب کاهش گلوکز خون می‌شود (۲۲). از آنجایی که یکی از داروهای موثر در درمان سندرم تخمدان پلی کیستیک

تشکر و قدردانی

این دانشگاه برخوردار بوده است. همچنین از شرکت گل دارو اصفهان که سیلیمارین را در اختیار ما قرار دادند، تقدیر و تشکر می‌کنیم.

این تحقیق در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی انجام شد و از حمایت دانشکده علوم زیستی

REFERENCES

1. Upadhy K, Trent M. Effects of polycystic ovary syndrome on health-related quality of life. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2007; 7:597-603.
2. Baillargeon JP. Use of insulin sensitizers in polycystic ovarian syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6:1012-22.
3. Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: Predisposition and mechanisms. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25: 603-609.
4. Skrtic A, Sokolic L, Borovecki A, Rosa J, et al. Immunohistochemical localization of CD31, NOTCH1 and JAGGED1 proteins in experimentally induced polycystic ovaries of immature rats. *Acta Histo chem* 2011; 113:262-9.
5. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 2004; 60:1-17.
6. Karimzadeh L, Nabiuni M, Sheikholeslami A, Irian S. Bee venom treatment reduced C-reactive protein and improved follicle quality in a rat model of estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2012; 18:384-92.
7. Karimzadeh L, Nabiuni M, Mohseni Kouchesfehiani H, Adham H. 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; 19:32.
8. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223-36.
9. Marx TL, Mehta AE. Polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleveland Clinic J Med* 2003; 70:31-45.
10. Spaczynski RZ, Arici A, Duleba AJ. Tumor necrosis factor-alpha stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1999; 61:993-98.
11. Gonza'lez N, Minium J, Kirwan J. Increased activation of nuclear factor-B triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1508-12.
12. Křen V, Walterova D. Silybin and silymarin – new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005; 149: 29-41.
13. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Rana P, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res* 2006; 26: 4457-98.
14. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and Silymarin, new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 2007; 14: 315-38.
15. Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E. Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 2001; 16: 1340-46.
16. Zafari Zangeneh F, Bagher M, Ashraf A, Ahangarpour A, Mousavizadeh K. Effects of Chamomile extract on biochemical and clinical parameters in a rat model of polycystic ovary syndrome. *J Reprod Infertil* 2010; 11:169-74.
17. Welschen R. Amount of gonadotropins required for normal follicular growth in hypoptesectomized adult rats. *Acta Endocrinol* 1973; 72:137-55.
18. Attarzadeh R, Sardar M, Taghavi M, Ayaz Khosh Hava F. The effects of an aerobic exercise program on LH, FSH, TST and DHEA levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *IJEM* 2012; 14: 39-46.
19. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223-36.
20. Doldi N, Gessi A, Destefani A, Calzi F, Ferrari A. Polycystic ovary syndrome: anomalies in progesterone production. *Hum Reprod* 1998; 13: 290-93.
21. Mohseni Kouchesfehiani H, Nabyooni M, Adham H. Effect of bee venom on polycystic ovarian syndrome in Rats. *Pajouhandeh* 2010; 15: 1-6. [In Persian]
22. Senthil Kumaran VA, Arulmalh K, Kalaiselvi P. Attenuation of the inflammatory changes and lipid anomalies by epigallocatechingallate in hypercholesterolemic diet feed agedrats. *Exp Gerontol* 2009; 112: 2735-52.

23. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Khastekhodaie Z. Evaluation of the effect of chronic administration of silymarin on thermal and chemical hyperalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. IJEM 2010; 11: 25-30.
24. Nabiuni M, Parivar K, Zynali B, Karimzadeh L. Changes in the expression of cyclooxygenase-2 in polycystic ovary syndrome in Wistar rats. Tehran University Medical Journal 2011; 69: 537-46.