

## مقاله پژوهشی

## تعامل اسید گالیک و تمرین شنا بر هیستولوژی تخمدان در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک

مریم ابراهیمی، نرگس ابرشهر، محمد امین عدالت منش\*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

\*مسئول مکاتبات: amin.edalatmanesh@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1947541.1348

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

## چکیده

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) علت اصلی ناباروری ناشی از فقدان تخمک‌گذاری و نتیجه استرس اکسایشی بافت تخمدان است که با اختلال در عملکرد تخمدان همراه می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر ۴ هفته تجویز اسید گالیک (GA) و تمرین شنا (EX) بر پارامترهای هیستولوژیک تخمدان در مدل PCOS می‌باشد. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با وزن  $10 \pm 180$  گرم به‌طور تصادفی در ۵ گروه کنترل، PCOS، PCOS + GA، PCOS + EX، و PCOS + GA + EX قرار گرفتند. برای ایجاد مدل PCOS، لتروزول (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۲۸ روز گاوآژ شد. سپس، تجویز خوراکی اسید گالیک به مدت ۴ هفته و تمرینات شنا ۳ جلسه در هفته و به مدت ۴ هفته انجام شد. در پایان، پس از تشریح تخمدان و رنگ‌آمیزی با هماتوکسی‌لین-ئوزین، ارزیابی‌های بافتی صورت گرفت. نتایج کاهش معنادار قطر جسم زرد، تعداد فولیکول‌های تک لایه، چند لایه، ثانویه، گراف و جسم زرد در گروه PCOS و نیز افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های آترتیک و کیستیک را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در حالی که تعامل تجویز اسید گالیک و تمرین شنا سبب بهبود شاخص‌های تخمدان گردید. با این حال، تغییر معناداری در قطر اووسیت و فولیکول‌های بدوی و چند لایه در گروه‌های مطالعه مشاهده نشد. به نظر می‌رسد گالیک اسید و تمرین شنا در بازگرداندن فولیکول‌زن موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS و بر روند تخمک‌گذاری موثر واقع شوند.

کلمات کلیدی: اسید گالیک، تمرین شنا، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، موش صحرایی.

## مقدمه

مشخص می‌گردد. از طرفی، طیف علائمی چون چاقی، هایپراندروژنیسم، اختلال در سیکل قاعدگی و نازایی به‌طور منفرد یا توأم بروز می‌نماید (۴). اختلالات هورمونی از جمله افزایش سطح سرمی هورمون‌های LH، تستوسترون، انسولین و پرولاکتین در این بیماری شایع بوده و سلامت زنان مبتلا به PCOS را در دراز مدت تحت تاثیر خود قرار می‌دهد

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) با عدم تخمک‌گذاری یا تخمک‌گذاری محدود (الیگواوولاسیون)، نازایی، پرمویی (هیروسوتیسم) و آکنه همراه است و با افزایش سطح بیولوژیک هورمون تستوسترون و افزایش تولید آندروژن‌های تخمدانی دیده شده است (۶). این بیماری ناهمگون با تغییر در ساختار تخمدان و وجود کیست‌های متعدد در سونوگرافی لگنی

به PCOS بهبود می‌بخشد. درمان چاقی می‌تواند با تغییر شیوه زندگی مانند رژیم، ورزش و درمان‌های پزشکی و جراحی امکان‌پذیر گردد (۳۰). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی می‌تواند در درمان مبتلایان به PCOS مفید باشد. با این که، افزایش فعالیت بدنی برای مبتلایان به PCOS توصیه شده است، غالباً محدودیت‌هایی در این زمینه نیز وجود دارد و هنوز درک کافی از میزان فعالیت ورزشی، نوع و مدت زمان آن در ارتباط با این بیماران وجود ندارد. با این حال، به نظر می‌رسد تمرینات منظم شنا به دلیل درگیری عضلات بزرگ و مفرح بودن در این بیماران مفید واقع گردد (۳۱).

از آنجایی که استرس اکسیداتیو نقش ویژه‌ای در اختلالات هیستوپاتولوژیک مرتبط با PCOS ایفاء می‌کند، ارزیابی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در بهبود علائم این سندرم حائز اهمیت است (۲). تری هیدروکسی بنزوئیک اسید که به اسید گالیک معروف است، یک اسید فنولی با فرمول شیمیایی  $C_7H_6O_5$  و با جرم مولی  $170/12 \text{ g/mol}$  است. استر موجود در اسید گالیک با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب‌های سلولی جلوگیری می‌کند. خواص آنتی‌اکسیدانی آن باعث حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌گردد و با اثر ضد تکثیر خود مانع از سرطانی شدن سلول‌ها می‌شود (۷).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اسید گالیک دارای اعمال ضد باکتری و ضد التهابی است. همچنین، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی آن از طریق مهار فعالیت آنزیم تیروزین کیناز نشان داده شده است (۸). در تحقیق دیگری مشخص شده است که اسید گالیک مانع از بالا رفتن چربی ناشی از دیس لیپیدمی می‌شود (۱). همچنین، اسید گالیک باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و افزایش میزان آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز

(۵). تظاهرات این سندرم در هنگام بلوغ بروز نموده و تصور می‌شود که با افزایش وزن در هنگام بلوغ در ارتباط باشد. به هر حال هنوز ژن یا ژن‌های دخیل در تخمدان پلی‌کیستیک شناسایی نشده‌اند و نقش عوامل محیطی از جمله تغییرات وزن، غلظت هورمون‌های در گردش و سن بروز بیماری نیز مشخص نیست (۲۹). توضیح احتمالی این ناهمگونی، وجود تفاوت‌های ژنتیکی در فعالیت ۵-آلفا ردوکتاز است. در PCOS، اختلال در قاعدگی به طور تبیین‌ناپذیر رخ می‌دهد که طیف آن از اولیگومنوره تا آمنوره متغیر است. به عنوان یک قانون، بیماران مبتلا به PCOS دچار عدم تخمک‌گذاری هستند. حتی در زنان هایپراندرورژنیک که دارای سیکل‌های قاعدگی منظم هستند، در ۲۱ درصد موارد عدم تخمک‌گذاری دیده شده است (۳۳).

زنان مبتلا به PCOS که دچار اولیگومنوره و یا آمنوره هستند در انتهای دوره باروری و با افزایش سن، قاعدگی منظم پیدا می‌کنند. این پدیده احتمالاً ناشی از کاهش تعداد فولیکول‌های رو به رشد به دنبال افزایش سن و همچنین تعادل بین اینهیبین-بتا و FSH در ابتدای فاز فولیکولار سیکل است (۳).

در بیش از ۵۰ درصد از بیماران چاقی وجود دارد. چربی بدن معمولاً در بخش‌های مرکزی (آندروئید) تجمع می‌یابد. چاقی به خصوص در قسمت فوقانی بدن رابطه مثبتی با هایپراندرورژنیسم و مقاومت به انسولین داشته و در حقیقت چاقی یکی از علائم شایع در PCOS است (۲۸).

کاهش وزن سبب بهبود پروفایل اندوکراینی، افزایش تخمک‌گذاری و حاملگی می‌گردد. تعدیل سیکل‌های قاعدگی و تخمک‌گذاری می‌تواند با کاهش حداقل ۵ درصد در وزن بدن رخ دهد. کاهش وزن نه تنها سبب بهبود سطوح آندروژن و گلوکز گردش خون می‌گردد، بلکه میزان تخمک‌گذاری و حاملگی را در زنان مبتلا

می‌شود که نشان دهنده اثر آنتی اکسیدانی آن است (۲۱).

بنابراین، هدف از تحقیق حاضر ارزیابی اثر ۴ هفته تمرین شنا، تجویز اسید گالیک و اثر تعاملی این دو بر شاخص‌های تخمدانی و پارامترهای مورفولوژیک تخمدان در مدل حیوانی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک القاء شده با لئروزول می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

**حیوانات و گروه‌بندی:** طی تحقیق تجربی حاضر ۴۰ سر موش صحرایی ماده دست نخورده از نژاد ویستار، با میانگین وزنی  $10 \pm 180$  گرم و سن  $5 \pm 60$  روز استفاده شد. حیوانات از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و تحت شرایط استاندارد دمایی ( $2 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد) و رطوبت ( $50 \pm 10$  درصد) و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۶ صبح تا ۶ عصر) نگهداری شدند. در این تحقیق تغذیه حیوانات با استفاده از غذای مخصوص موش آزمایشگاهی با فرمولاسیون استاندارد (شرکت تولیدی غذای دام و طیور فارس) استفاده شد. همچنین، آب آشامیدنی در اختیار حیوانات قرارگرفت. جهت ایجاد سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت یک هفته از استقرار حیوانات صورت گرفت. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز (کد اخلاق: IAUSHIRAZ.98.211.25) انجام شد. تمامی اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها تحت بیهوشی کامل صورت گرفت و همچنین سعی شده است از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود.

حیوانات به صورت تصادفی در ۵ گروه ( $n=8$ ) به شرح زیر تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل: حیوانات این گروه هیچ نوع تیماری نداشته و به منظور بررسی‌های

بافت‌شناسی با سایر گروه‌های مورد مطالعه استفاده شدند. ۲- گروه PCOS: در این گروه حیوانات به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن لئروزول (لتراکس، شرکت داروسازی ابوریحان، ایران) به صورت خوراکی جهت القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دریافت نمودند. سپس، به مدت ۴ هفته نرمال سالین به آنها گاوژ شد. ۳- گروه PCOS+EX: در این گروه پس از القای سندرم، تمرینات شنا به مدت ۴ هفته انجام شد. ۴- گروه PCOS + GA: در این گروه پس از القاء PCOS، اسید گالیک (Sigma-) (Aldrich, Germany) با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴ هفته به صورت خوراکی تجویز شد. ۵- گروه PCOS + EX + GA: حیوانات این گروه پس از القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، همزمان با تمرین شنا، تجویز گاوژ گالیک اسید را به مدت ۴ هفته دریافت نمودند.

**القای مدل:** برای اجرای این تحقیق، در ابتدا حیواناتی انتخاب شدند که دارای ۲ الی ۳ دوره استروس منظم در طی ۱۲ الی ۱۴ روز مشاهده اسمیر واژینال، بودند. جهت ارزیابی منظم بودن سیکل استروس روش پاپ اسمیر مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های صحرایی که در مرحله استروس از سیکل تولید مثلی بودند، جهت مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در مرحله استروس دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی‌تلیال بوده و فاقد لوکوسیت است (۱۸). لازم به ذکر است که در این تحقیق از بین ۶۷ سر موش صحرایی ماده، ۴۰ سر که در مرحله استروس بودند، انتخاب گردید. جهت القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های صحرایی از تجویز خوراکی ۱ میلی‌گرم لئروزول به مدت ۲۸ روز استفاده شد (۲۵). به دنبال تجویز لئروزول سیکل‌های استروس نامنظم می‌شوند. نامنظم شدن سیکل‌های استروس و مشاهده سلول‌های شاخی شده اسمیر

واژینال یکی از علائم وجود کیست‌های فولیکولی در تخمدان است (۱۷). در همه نمونه‌های مورد مطالعه که به صورت تصادفی از گروه‌های مختلف انتخاب شدند، ۲۸ روز پس از تجویز لتروزول سلول‌های شاخی شده غالب و عدم تغییرات سلولی (کروی شدن و متراکم شدن سلول‌ها) در طی ۴ روز متوالی در اسمیر واژینال دیده شد. همچنین، جهت تایید مدل در پایان دوره ۲۸ روزه تجویز لتروزول، چند حیوان جهت ارزیابی تخمدان‌ها به صورت تصادفی انتخاب و با دوز کشنده کلروفورم بیهوش شدند. تخمدان‌ها از بدن خارج شد و به صورت ماکروسکوپی و نیز هیستولوژیک جهت ایجاد و مشاهده کیست‌های تخمدانی مورد بررسی قرار گرفتند.

**پروتکل تمرین شنا:** پروتکل تمرین شامل ۴ هفته شنا کردن در استخر مدور مخصوص شنای جوندگان با قطر یک متر، ارتفاع آب ۵۰ سانتی‌متر و دمای آب  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در هر جلسه و سه جلسه در هفته بود. حیوانات یک دقیقه قبل از تمرین برای آشنایی با محیط و گرم کردن وارد استخر شدند. هر حیوان از یک بخش ثابت استخر رها شدند. این کار برای تمامی حیوانات به طور ثابت انجام شد. پس از پایان تمرین حیوانات خشک شده و به قفس‌های خود انتقال داده شدند. در مدت یک هفته قبل از تمرین اصلی، حیوانات به مدت ۸ دقیقه تمرین شنا انجام دادند و روزانه ۲ دقیقه به زمان شنا اضافه شد، تا در پایان یک هفته به ۲۰ دقیقه رسید. به کمک نرم‌افزار ردیاب سرعت شنا در همه موش‌های صحرایی مشخص گردید. متوسط سرعت شنا در همه گروه‌ها یکسان بود. در مدت زمان تمرین اصلی آب موجود در استخر به کمک پمپ آب، موج و دارای تلاطم شد تا امکان بی‌حرکت ماندن حیوان در طول مدت زمان حضور در استخر شنا وجود نداشته باشد (۲۶).

**مطالعات بافتی:** پس از بیهوش کردن حیوانات با دوز کشنده کلروفورم، تخمدان‌ها از بدن حیوانات جدا شد و پس از شستشو با نرمال سالین و جدا کردن بافت‌های چربی اطراف توزین شدند. سپس، در فیکساتور پارافمالدهید (Merck, Germany) به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. جهت پردازش بافتی از دستگاه اتوتکنیکون (تیشو پروسور) استفاده شد و اسلایدهای آماده شده با رنگ همتوکسی‌لین-اوتوزین (Merck, Germany) رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدهای تهیه شده از بخش‌های مختلف تخمدان امکان شمارش کل فولیکول‌ها را در هر تخمدان فراهم نمود. در هر اسلاید به ترتیب فولیکول‌های بدوی، تک لایه، چند لایه، فولیکول ثانویه (آنترال)، گراف و جسم زرد توسط میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفتند. تصویربرداری با میکروسکوپ نوری (Olympus-BH<sub>2</sub>, Japan) متصل به سیستم کامپیوتری انجام شد (۱۳). همچنین، قطر جسم زرد و اووسیت در فولیکول‌های مختلف توسط نرم افزار استرنولایت اندازه گیری شد.

**ارزیابی آماری:** تجزیه و تحلیل آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS ورژن ۲۰ انجام شد. جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف استفاده گردید. همچنین، به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های مورد نظر و نیز اندازه اثر دو متغیر (اسید گالیک و تمرین شنا) در تعامل با یکدیگر از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و از نظر آماری مقادیر  $p < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که در تعداد فولیکول‌های بدوی هیچ اختلاف معناداری بین

شد ( $p < 0/05$ )، گروه‌های PCOS + EX و PCOS + GA اختلاف معناداری با گروه PCOS نشان ندادند. همچنین، تمرین شنا و مصرف اسید گالیک اثر تعاملی بر افزایش تعداد فولیکول‌های چند لایه نداشت ( $F=8/61$ ،  $p=0/07$  و اندازه اثر  $0/10$ ). ارزیابی تعداد فولیکول‌های گراف در گروه‌های مطالعه نشان داد که بین گروه PCOS و گروه کنترل اختلاف معنادار بود (جدول ۱). در واقع در هیچ یک از اسلایدهای مورد بررسی از گروه PCOS نشانی از فولیکول گراف نبود ( $p < 0/01$ ). همچنین، بین گروه‌های PCOS + EX، PCOS + GA نیز با گروه کنترل اختلاف معنادار دیده شد و در این گروه‌ها کاهش معناداری در تعداد فولیکول‌های گراف نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/05$ ). همچنین، بین گروه PCOS + EX + GA با گروه PCOS اختلاف معنادار بود ( $p < 0/01$ ). همچنین، تعامل تمرین شنا و اسید گالیک بر افزایش تعداد فولیکول‌های گراف معنادار بود ( $p = 0/02$ )،  $F=15/42$  و اندازه اثر  $0/27$ .

افزایش معنادار تعداد فولیکول‌های کیستیک و آترتیک در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/001$ ). در گروه کنترل هیچ نشانه‌ای از حضور فولیکول‌های کیستیک نبود (جدول ۱). تعداد فولیکول‌های کیستیک و آترتیک در گروه‌های PCOS + EX، PCOS + GA و PCOS + EX + GA نسبت به گروه PCOS به صورت معناداری کاهش داشت ( $p < 0/001$ ). در گروه PCOS + EX + GA اثری از فولیکول‌های کیستیک دیده نشد. تعامل تمرین شنا و اسید گالیک در کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک معنادار نبود ( $F=3/62$ ،  $p = 0/08$  و اندازه اثر  $0/11$ ) ولی در کاهش تعداد فولیکول‌های کیستیک معنادار بود ( $F=18/11$ ،  $p = 0/004$  و اندازه اثر  $0/25$ ).

کاهش معنادار تعداد جسم زرد در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/001$ ). بین

گروه‌های مطالعه وجود ندارد (جدول ۱). همچنین، نتایج آزمون تحلیل واریانس دو راهه جهت بررسی اثر تمرین شنا، مصرف اسید گالیک و اثر تعاملی تمرین شنا و مصرف اسید گالیک نشان داد، چهار هفته تمرین شنا ( $F=2/64$ ،  $p=0/1$  و اندازه اثر  $0/04$ ) و مصرف اسید گالیک ( $F=3/40$ ،  $p=0/08$  و اندازه اثر  $0/05$ ) اثر معنی‌داری بر تعداد فولیکول‌های بدوی در موش‌های صحرائی مدل PCOS ندارد. همچنین، تمرین شنا و مصرف اسید گالیک دارای اثرات تعاملی بر افزایش تعداد فولیکول‌های بدوی نیست ( $p=0/15$ )،  $F=2/16$  و اندازه اثر  $0/02$ ). در تعداد فولیکول‌های تک لایه، گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد ( $p < 0/01$ ). همچنین، بین گروه‌های PCOS+EX و PCOS+GA نیز اختلاف معناداری با گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/05$ ). از طرفی، گروه PCOS+EX+GA نسبت به گروه PCOS افزایش معناداری را در تعداد فولیکول‌های تک لایه نشان داد ( $p < 0/05$ ). از طرفی، تمرین شنا و مصرف اسید گالیک دارای اثرات تعاملی بر افزایش تعداد فولیکول‌های تک لایه می‌باشد ( $F=14/23$ ،  $p=0/005$ ) و اندازه اثر  $0/18$ ). ارزیابی تعداد فولیکول‌های چند لایه نشان داد که اختلاف معناداری بین گروه‌های مطالعه وجود ندارد و همچنین، اثر تعاملی تمرین شنا و مصرف اسید گالیک بر افزایش تعداد فولیکول‌های چند لایه معنادار نیست (جدول ۱)،  $F=2/01$ ،  $p=0/34$  و اندازه اثر  $0/09$ .

مطالعه تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه PCOS و در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان داد (جدول ۱). در واقع، کاهش معناداری در تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل وجود داشت ( $p < 0/01$ ). با این که تنها در گروه PCOS + EX + GA نسبت به گروه PCOS افزایش معناداری در تعداد فولیکول‌های ثانویه دیده

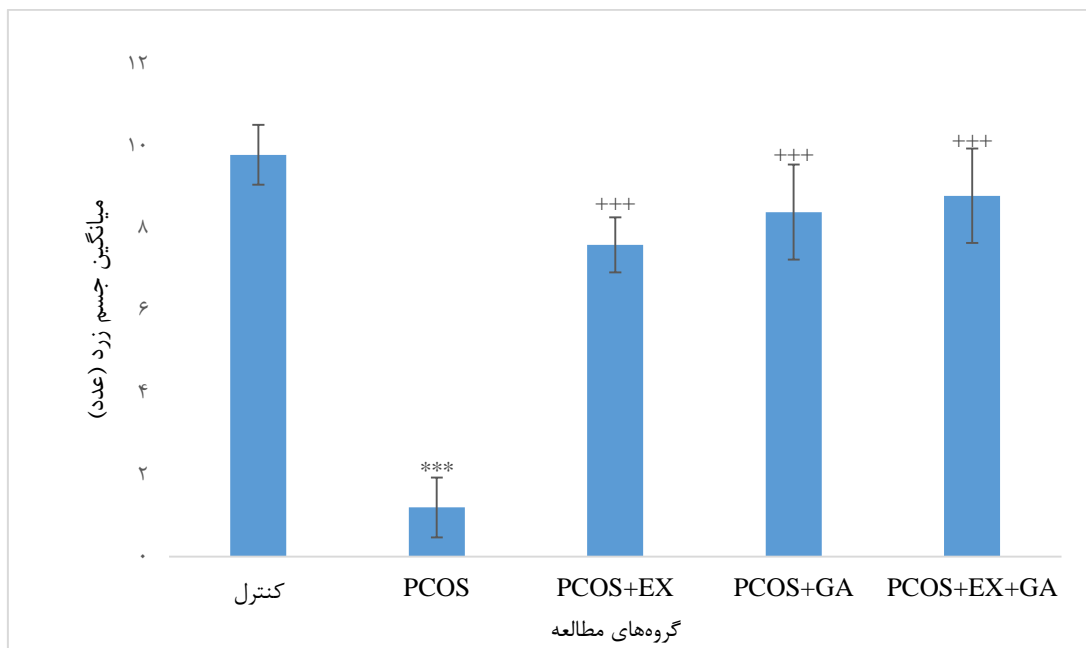
قطر جسم زرد کاهش معناداری در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $p < 0/001$ ). قطر جسم زرد در گروه‌های PCOS + GA، PCOS + EX و PCOS + EX + GA به طور معناداری بیشتر از گروه PCOS بود ( $p < 0/001$ ). همچنین، هیچ اختلاف معناداری بین این سه گروه با گروه کنترل دیده نشد. تعامل تمرین شنا و گالیک اسید در افزایش قطر جسم زرد معنادار نبود (شکل ۲،  $p=0/075$ ،  $F=3/82$  و اندازه اثر  $0/02$ ). اندازه کاهش یافته قطر جسم زرد در شکل ۵ دیده می‌شود.

سایر گروه‌های مطالعه با گروه کنترل اختلاف معنادار نبود (شکل ۱). همچنین، هر سه گروه PCOS + EX، PCOS + GA و PCOS ( $p < 0/001$ ) افزایش معناداری را در  $EX + GA$  ( $p < 0/001$ ) نشان دادند. با این حال، اختلاف معناداری در ارزیابی تعامل اسید گالیک و تمرین شنا بر افزایش تعداد جسم زرد دیده نشد ( $p=0/23$ ،  $F=1/94$  و اندازه اثر  $0/08$ ). علیرغم اینکه قطر اووسیت در گروه‌های مطالعه اختلاف معناداری با یکدیگر نداشت (شکل ۴) در

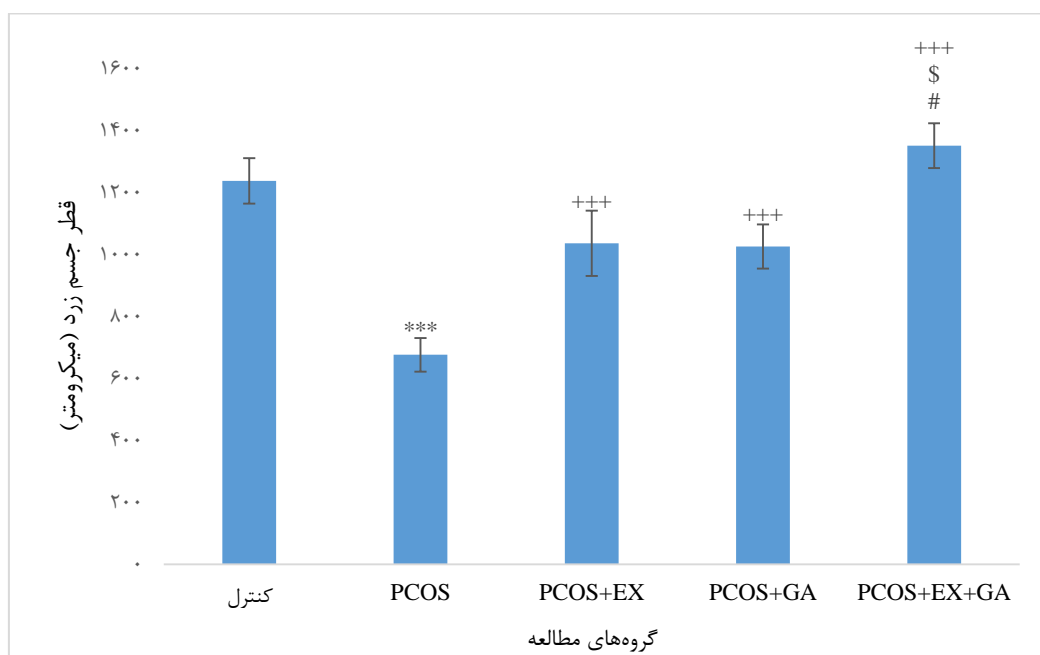
جدول ۱- ارزیابی تعداد فولیکول‌های مختلف تخمدان در گروه‌های مطالعه

PCOS+EX+GA	PCOS+GA	PCOS+EX	PCOS	کنترل	فولیکول / گروه
16/78 ± 1/59 a	16/02 ± 2/70 a	17/18 ± 0/86 a	14/00 ± 1/78 a	17/60 ± 2/2 a	بدوی
7/57 ± 1/20 ac	4/93 ± 1/27 b	4/80 ± 1/35 b	3/21 ± 0/58 b	9/62 ± 1/02 a	تک لایه
7/40 ± 1/02 a	7/00 ± 0/42 a	7/50 ± 0/81 a	5/60 ± 1/63 a	8/60 ± 1/16 a	چند لایه
4/92 ± 0/71 a	4/56 ± 2/11 ab	4/30 ± 0/91 ab	2/20 ± 0/73 b	5/80 ± 0/65 a	ثانویه
2/16 ± 0/37 ac	0/80 ± 0/05 b	0/40 ± 0/24 b	0/00 ± 0/00 b	2/60 ± 0/50 a	گراف
3/60 ± 0/41 a	4/47 ± 1/02 a	4/96 ± 1/12 a	15/80 ± 2/31 b	3/60 ± 0/72 a	آترتیک
0/00 ± 0/00 ad	0/83 ± 0/04 c	0/80 ± 0/17 c	7/80 ± 1/85 b	0/00 ± 0/00 a	کیستیک

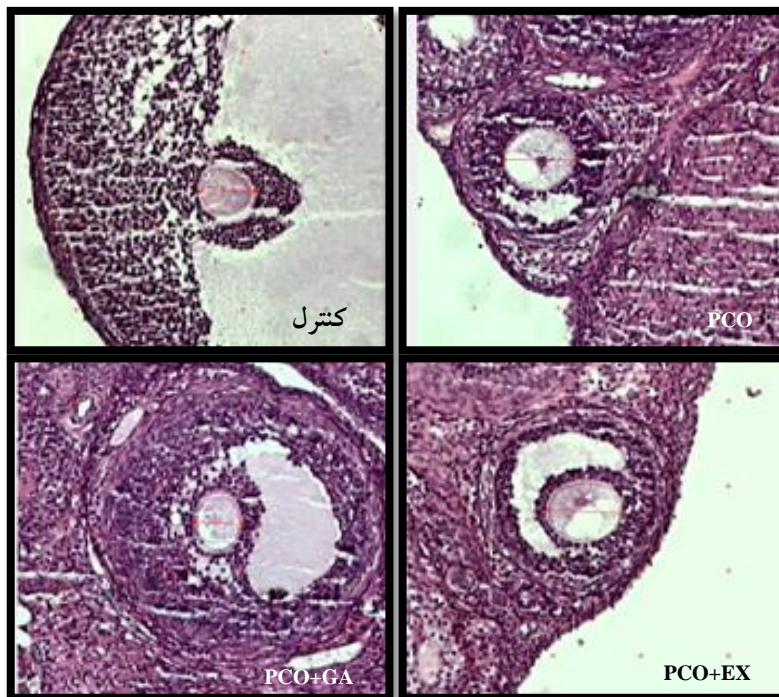
نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. ستون‌های دارای حرف مشترک تغییر معناداری را نشان نمی‌دهند، اما ستون‌های فاقد حرف مشترک اختلاف معناداری را نشان می‌دهند.



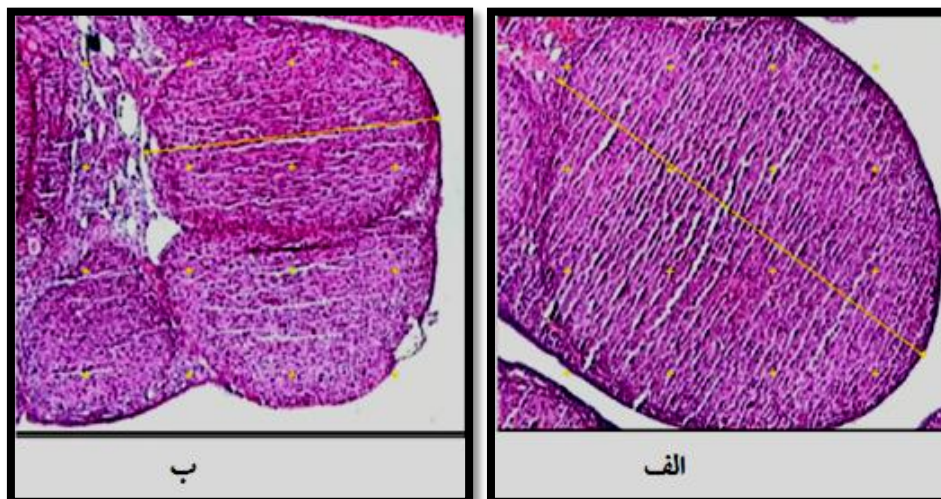
شکل ۱- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار تعداد جسم زرد در گروه‌های مختلف: نتایج نشان می‌دهد که بین گروه کنترل با گروه PCOS ( $p < 0/0001$ ) و نیز بین گروه PCOS با گروه‌های PCOS + EX، PCOS + GA و PCOS + EX + GA اختلاف معنادار دیده شد ( $p < 0/0001$ ).



شکل ۲- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار قطر جسم زرد در گروه‌های مختلف: نتایج نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه کنترل با گروه PCOS ( $p < 0/0001$ ) و نیز بین گروه PCOS با گروه‌های PCOS+EX، PCOS+GA و PCOS+EX+GA می‌باشد ( $p < 0/0001$ ). همچنین، بین گروه PCOS+EX+GA با گروه PCOS+EX ( $p < 0/05$ ) و با گروه PCOS+GA ( $p < 0/05$ ) نیز اختلاف معنادار است.



شکل ۳- فتومیکروگراف نوری از اندازه‌گیری قطر اووسیت، در فولیکول‌های مختلف تخمدان در نرم افزار استرنولایت. رنگ آمیزی H&E بزرگنمایی  $100\times$ . تفاوتی در قطر اووسیت در گروه‌های مختلف دیده نشد.



شکل ۴- فتومیکروگراف نوری از اندازه‌گیری قطر جسم زرد تخمدان در نرم افزار استرنولایت رنگ‌آمیزی H&E بزرگنمایی  $100\times$ . تصویر (الف) قطر جسم زرد در گروه کنترل را نشان می‌دهد و تصویر (ب) کاهش معنی دار قطر جسم زرد در گروه PCOS را نشان می‌دهد.

#### بحث

است که با افزایش کیست‌های تخمدانی در نهایت منجر به ناباروری می‌گردد. این سندرم با رشد سریع

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) شایعترین اختلال اندوکرین ناهمگن در زنان طی سنین باروری



تحت تیمار قرار گرفته‌اند، بسیار مشابه با بافت تخمدان در افراد مبتلا به PCOS است (۱۰). در مدل حیوانی و بیماری انسانی، کیست‌های متعدد با یک لایه از سلول‌های گرانولوزا و لایه‌های متعدد از سلول‌های تک داخلی مشاهده می‌شود. این یافته‌های هیستولوژی در اصل، به دلیل تغییر در سطوح FSH و افزایش LH و فقدان اثر متقابل بین سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکا است که از اوولاسیون ممانعت می‌کند (۱۵).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در PCOS فولیکول‌ها حداکثر تا مرحله آنترال میانی پیش می‌روند و پس از آن روند بلوغ متوقف شده و با آپوتوتیک شدن سلول‌های گرانولوزا فولیکول‌ها دچار آترزی می‌شوند، رشد فولیکول‌ها متوقف شده و فولیکول‌های کیستیک و آترتیک تشکیل می‌شوند (۹). نتیجه این فرایند با کاهش تعداد فولیکول‌های ثانویه و گراف در مطالعه حاضر در گروه PCOS دیده شد.

یکی از عوامل درگیر در آتیولوژی PCOS افزایش استرس اکسیداتیو به واسطه تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) و کاهش کارایی دفاع آنتی‌اکسیدانی است (۲۲). به طوری که یکی از مهمترین اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد شروع پراکسیداسیون لیپیدها است که موجب آسیب غشای سلول می‌شود (۱۴).

این رادیکال‌ها می‌توانند با حمله به اسیدهای چرب اشباع نشده منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و صدمات بافتی شوند. از طرفی دیگر این رادیکال‌های آزاد باعث قطعه قطعه شدن DNA شده و سلول دیگر نمی‌تواند مسیر ترمیم DNA را از سر گیرد. بنابراین، وارد مسیر آپوتوز می‌شود (۱۲) که این امر احتمالاً یکی از دلایل افزایش آپوتوز سلول‌های گرانولوزا و ایجاد فولیکول‌های آترتیک و کیستیک در مطالعه حاضر است. با توجه به این موضوع، تعدیل فرایند

فولیکولی، عدم انتخاب یک فولیکول غالب از ذخیره فولیکولی (توقف رشد فولیکولی)، تجمع حداقل ۱۰ کیست در اطراف استرومای تخمدان، افزایش حجم تخمدان، افزایش لایه تک تخمدان (هایپر تکازیسیم)، هایپراندرژیسیسم و افزایش نسبت LH به FSH نمایان می‌شود (۱۹).

در مطالعه حاضر پس از القای PCOS در موش‌های صحرایی کاهش معناداری در تعداد فولیکول‌های تک لایه، ثانویه، گراف، جسم زرد و افزایش معناداری در تعداد فولیکول‌های آترتیک و کیستیک در گروه دریافت کننده لئروزول نسبت به گروه دریافت کننده کنترل مشاهده شد. اما تغییر معناداری در تعداد فولیکول‌های بدوی، چند لایه و قطر تخمک در گروه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. جهت القای PCOS، در تحقیق حاضر از مهارکننده آنزیم آروماتاز یعنی لئروزول استفاده گردید. لئروزول، یک مهارکننده آروماتازی غیراستروئیدی است و توانایی زیادی در مهار کردن آنزیم آروماتاز دارد. کاهش فعالیت آنزیم آروماتاز باعث اختلال در سنتز استروئیدهای تخمدان شده که در نهایت سبب القای PCOS می‌شود. این آنزیم بیوستنز استروژن از آندروژن را کاتالیز می‌کند، کاهش فعالیت این آنزیم باعث مهار آروماتیزاسیون تستوسترون به استرادیول شده در نتیجه میزان تستوسترون افزایش و میزان استروژن کاهش می‌یابد. با کاهش میزان استروژن تخریب و آپوتوز سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های تخمدانی رخ می‌دهد (۲۳).

در مطالعه حاضر نیز متعاقب تجویز لئروزول افزایش معناداری در تعداد فولیکول‌های آترتیک بافت تخمدان مشاهده گردید که با نتایج مطالعات قبل هم‌خوانی دارد. همچنین تعداد فولیکول‌های کیستیک و آترتیک در گروه دریافت کننده لئروزول افزایش معناداری را نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد. مطالعات نشان می‌دهد که بافت تخمدان حیواناتی که با لئروزول

استرس اکسیداتیو و استفاده از قدرت آنتی‌اکسیدانی اسید گالیک در بهبود علائم PCOS نقش موثری ایفا نمود. در مطالعات متعدد ارتباط اسید گالیک و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن با کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو تایید شده است (۲۰).

اسید گالیک توانایی زیادی در حذف رادیکال‌های آزاد به عنوان مثال آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و هیپوکلریت دارد و با کاهش پراکسیداسون لیپیدی موجب کاهش سطح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) می‌شود (۳۴). از طرفی، شواهدی مبنی بر رابطه مستقیم و نزدیک بین استرس اکسیداتیو - التهاب و PCOS دیده می‌شود. مقدار غیر متعارف ROS تولید شده در بیماران PCOS سبب القای استرس اکسیداتیو در سلولها شده و با فعال نمودن مسیر فاکتور هسته ای کاپا B (NF-KB) سبب افزایش رونویسی فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (TNF- $\alpha$ ) و مهار فعالیت تیروزین کینازی می‌شود که مقاومت به انسولین و ایجاد کیست‌های حاصل در بیماران PCOS از اختلال در فعالیت این آنزیم ناشی می‌شوند (۲۷). بنابراین، می‌توان عنوان نمود که اسید گالیک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث مهار آسیب‌های ناشی از فعال شدن رادیکال‌های آزاد و تعدیل نشانه‌های PCOS می‌گردد.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی نقش مهمی در تعدیل هورمونی و بهبود سطح آنتی‌اکسیدانی دارند. هرچند، تمرینات ورزشی و افزایش فعالیت بدنی در زنان مبتلا به PCOS توصیه شده است. با این حال، هنوز درک کافی از نوع، شدت و مدت زمان فعالیت ورزشی در این بیماران وجود ندارد (۱۱). در مطالعه حاضر ۴ هفته تمرین شنا سبب بهبود معنادار شاخص‌های تخمدان در PCOS گردید. در همین راستا، مطالعه دیگری نشان داده است که ۵ هفته تمرین استقامتی به کمک نوار گردان سبب بهبود

مورفولوژی تخمدان در موش‌های صحرایی مدل PCOS شده است (۱۶). تمرینات ورزشی مانند تمرین شنا که با درگیری عضلات بزرگ همراه هستند، می‌توانند سبب بهبود مورفولوژی تخمدان، افزایش فولیکول‌های آنترال و افزایش ضخامت دیواره سلولی و لایه تکا در موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS گردند (۳۲). ارزیابی مورفولوژی تخمدان در مطالعه کیو و همکارانش کاهش تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال و آترتیک را متعاقب فعالیت بدنی نشان داده است. همانند مطالعه حاضر، تعداد فولیکول‌های آنترال نیز در گروه تمرین کننده نسبت به گروه بدون تمرین افزایش معناداری نشان داد (۲۴). هر چند، بر خلاف مطالعه حاضر، تغییرات مورفولوژیکی تخمدان در هر دو گروه تمرین و بدون تمرین مشابه یکدیگر بود. با این حال، در مدت زمان تمرین شنا و نژاد حیوانات تفاوت‌هایی وجود داشت.

### نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که تجویز اسید گالیک و تمرین شنا و اثر تعاملی این دو سبب بهبود نشانه‌های تخمدانی PCOS می‌گردد. اسید گالیک و تمرین شنا احتمالاً دارای اثرات مهاری در ایجاد فولیکول‌های کیستیک و آترتیک می‌باشند، به طوری که سبب تخمک‌گذاری و بهبود هیستولوژی تخمدان‌های پلی‌کیستیک و سوق آن به سمت تخمدان‌های سالم و فعال می‌گردد. همچنین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت احتمالاً تعامل اسید گالیک و تمرین شنا جهت کاهش برخی عوارض سندرم تخمدان پلی-کیستیک مفید باشد.

### تشکر و قدردانی

از همکاری حوزه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در فراهم کردن تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

understanding the etiopathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Life Science*, 280:119753.

10. Guo Y., Qi Y., Yang X., Zhao L., Wen S., Liu Y., Tang L. 2016. Association between polycystic ovary syndrome and gut microbiota. *PLoS One*, 11(4): e0153196.

11. Hakimi O., Cameron L.C. 2017. Effect of Exercise on Ovulation: A Systematic Review. *Sports Medicine*, 47(8):1555-1567.

12. Hyderali B.N., Mala K. 2015. Oxidative stress and cardiovascular complications in polycystic ovarian syndrome. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 191:15-22.

13. Jelodar G., Masoomi S., Rahmanifar F. 2018. Hydroalcoholic extract of flaxseed improves polycystic ovary syndrome in a rat model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6):645-650.

14. Li W., Li D., Kuang H., Feng X., Ai W., Wang Y., 2020. Berberine increases glucose uptake and intracellular ROS levels by promoting Sirtuin 3 ubiquitination. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121: 109563.

15. Maliqueo M., Benrick A., Stener-Victorin E. 2014. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(3):183-193.

16. Manni L., Cajander S., Lundeberg T., Naylor A.S., Aloe L., Holmäng A., 2005. Effect of exercise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and alpha(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(12):846-858.

17. Matsuzaki T., Tungalagsuvd A., Iwasa T., Munkhzaya M., Yanagihara R., Tokui T., 2017. Kisspeptin mRNA expression is increased in the posterior hypothalamus in the rat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrine Journal*, 64(1):7-14.

## منابع

1. Abdel-Moneim A., El-Twab S.M.A., Yousef A.I., Reheim E.S.A., Ashour M.B. 2018. Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2 diabetes by gallic acid and p-coumaric acid: The role of adipocytokines and PPAR $\gamma$ . *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105:1091-1097.

2. Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A., Gupta S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012;10:49.

3. Azziz R. 2018. Polycystic Ovary Syndrome. *Obstetrics and Gynecology* 132(2):321-336.

4. Barber T.M., Dimitriadis G.K., Andreou A., Franks S. 2015. Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance. *Clinical Medicine (Lond)*, 16(3):262-266.

5. Barber T.M., Franks S. 2021. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 95(4):531-541.

6. Barber T.M., Hanson P., Weickert M.O., Franks S. 2019. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*, 13: 1179558119874042.

7. Choubey S., Goyal S., Varughese L.R., Kumar V., Sharma A.K., Beniwal V. 2018. Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(15):1283-1293.

8. Choubey S., Varughese L.R., Kumar V., Beniwal V. 2015. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 4(4):305-315.

9. Corrie L., Gulati M., Singh S.K., Kapoor B., Khursheed R., Awasthi A. 2021. Recent updates on animal models for

26. Rafiei S., Ravasi A.A., Gaeini A.A. 2021. The effect of eight-week swimming exercise and gallic acid on hippocampal BDNF and oxidative stress parameters in Trimethyltin induced cognitive deficits. *Jorjani Biomedicine Journal*, 9(1): 55-68.
27. Roidoung S., Dolan K.D., Siddiq M. 2016. Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. *Food Chemistry*, 210:422-427.
28. Rosenfield R.L. 2015. The polycystic ovary morphology-polycystic ovary syndrome spectrum. *Journal of Pediatrics and Adolescent Gynecology*, 28(6):412-419.
29. Sanchez-Garrido M.A., Tena-Sempere M. 2020. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. *Molecular Metabolism*, 35:100937.
30. Stepto N.K., Hiam D., Gibson-Helm M., Cassar S., Harrison C.L., Hutchison S.K. 2020. Exercise and insulin resistance in PCOS: muscle insulin signalling and fibrosis. *Endocrine Connection*, 9(4):346-359.
31. Woodward A., Klonizakis M., Broom D. 2020. Exercise and polycystic ovary syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1228:123-136.
32. Wu C., Lin F., Qiu S., Jiang Z. 2014. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. *PLoS One*, 9(6): e99155.
33. Zeng X., Xie Y.J., Liu Y.T., Long S.L., Mo Z.C. 2020. Polycystic ovarian syndrome: correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity. *Clinica Chimica Acta*, 502:214-221.
34. Zuo T., Zhu M., Xu W. 2016. Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:8589318.
18. Mazloom B.F., Edalatmanesh M.A., Hosseini S.E. 2019. Gallic acid reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative damage in a rat model of estradiol-induced polycystic ovary. *Comparative Clinical Pathology*, 28: 1281-1286.
19. Mehraban M., Jelodar G., Rahmanifar F. 2020. A combination of spearmint and flaxseed extract improved endocrine and histomorphology of ovary in experimental PCOS. *Journal of Ovarian Research*, 13(1): 32.
20. Moghadas M., Edalatmanesh M.A., Robati R. 2016. Histopathological analysis from gallic acid administration on hippocampal cell density, depression, and anxiety related behaviors in a trimethyltin intoxication model. *Cell Journal*, 17(4): 659-667.
21. Moghtaderi H., Sepehri H., Delphi L., Attari F. 2018. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *Bioimpacts*, 8(3):185-194.
22. Mohammadi M. 2019. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: A brief review. *International Journal of Preventive Medicine*, 17(10):86.
23. Noroozadeh M., Behboudi-Gandevani S., Zadeh-Vakili A., Ramezani Tehrani F. 2017. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Science*, 191:259-272.
24. Qiu S., Wu C., Lin F., Chen L., Huang Z., Jiang Z. 2009. Exercise training improved insulin sensitivity and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome. *Hormone and Metabolic Research*, 41(12): 880-885.
25. Rafiei S., Edalatmanesh M.A. 2018. The effect of swimming training, Gallic acid and high-fat diet on the serum levels of sex hormones in rats with polycystic ovary syndrome. *Feyz*, 22(6):564-572. [Persian]

## **The Interaction of Gallic Acid and Swimming Training on Ovarian Histology in Rats with Polycystic Ovary Syndrome**

Maryam Ebrahimi, Narges Abarshahr, Mohammad Amin Edalatmanesh\*

Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University,

Shiraz, Iran

### **Abstract**

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the leading cause of infertility due to lack of ovulation and the result of oxidative stress of ovarian tissue, which is associated with disability in ovarian functions. This study aims at evaluating the effect of 4 weeks of Gallic Acid (GA) prescription and swimming (EX) training on ovarian tissue parameters in PCOS model. Forty adult Wistar female rats weighing  $180 \pm 10$  g were randomly divided into 5 groups: PCOS, PCOS + GA, PCOS + EX and PCOS + GA + EX. To induce the PCOS model, letrozole (1 mg / kg) was NG tubed for 28 days. Then, GA was prescribed orally for 4 weeks and swimming was performed for 4 weeks and 3 sessions per week. Finally, after dissection of the ovary and staining with hematoxylin-eosin, histological evaluations were performed. The results showed a significant decrease in corpus luteum diameter, number of monolayer, multilayer, secondary and Graafian follicles and corpus luteum in PCOS group and also a significant increase in the number of atretic and cystic follicles compared with control group. While the interaction of GA prescription and swimming improved ovarian parameters. However, no significant change in the diameter of oocytes and primary and multilayered follicles was observed in the groups. GA and swimming appear to be effective on restoring the folliculogenesis of PCOS rat model and the ovulation process.

**Keywords:** Gallic acid, Swimming, Polycystic ovary syndrome, Rat.

