

بررسی اثر اوژنول بر پانکراس رت نژاد ویستار مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک القاء شده با استرادیول والرات

زهرا کوکیان^۱، زهرا حاج ابراهیمی^{۲*}، پریچهره یغمایی^۱، سید بهنام الدین جامعی^۳

چکیده

درون‌ریز در زنان در سنین باروری است. هیپراندرورژنیسم به عنوان عاملی در تشدید علائم تولیدمثلی و ایجاد سندرم متابولیک در PCOS شناخته شده است. اعتقاد بر این است که آندروژن بیش از حد در درجه اول از تخمدان و غده فوق کلیوی است. اگرچه هیپراندرورژنیسم آدرنال ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران PCOS را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). اما هیچ تأثیری بر اختلال متابولیک در بیماران PCOS ندارد (۲). با این حال، آندروژن بیش از حد از تخمدان‌ها به عنوان مهم‌ترین محرک PCOS در نظر گرفته می‌شود (۱). سندرم تخمدان پلی‌کیستیک ارتباط نزدیکی با بسیاری از اختلالات متابولیک دارد. اگرچه مقاومت به انسولین به عنوان یک عامل خطر مهم برای سندرم متابولیک و سایر بیماری‌های مرتبط با PCOS عمل می‌کند، هیپراندرورژنیسم همچنین می‌تواند یک عامل خطر مستقل برای دیابت نوع ۲، چاقی، بیماری‌های قلبی عروقی و سندرم متابولیک در بیماران زن باشد. آندروژن بیش از حد، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) را با القای فعالیت‌های سلولی مانند آپوپتوز، اتوفازی، اختلال عملکرد میتوکندری و استرس شبکه آندوپلاسمی در یاخته‌های گرانولوزا و تخمک‌ها تحریک و ترویج می‌کند (۳). اوژنول (C₁₀H₁₂O₂) یک ترکیب معطر متعلق به گروه فنل‌ها است. معمولاً از اسانس‌های طبیعی گیاهان از خانواده‌های Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae و Myristicaceae به دست می‌آید و مهم‌ترین جزء روغن

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز زنان در سنین باروری است. علت PCOS هنوز شناخته نشده است با این حال مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت به انسولین نقش مهمی در پاتوژنز این سندروم دارد. علاوه بر مقاومت به انسولین نشان داده شده است که برخی زنان مبتلا به PCOS تغییراتی در عملکرد یاخته‌های بتا دارند. اوژنول دارویی با خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانسی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر درمانی اوژنول بر بافت پانکراس در رت‌های ماده نژاد ویستار مبتلا به PCOS بود. در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. برای القاء سندروم تخمدان پلی‌کیستیک استرادیول والرات با دوز ۴ mg/kg به صورت درون صفاقی به مدت ۲۸ روز تزریق گردید. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل و PCOS دریافت کننده غذای معمولی، گروه شم دریافت کننده حلال، و دو گروه تیمار با تزریق درون صفاقی اوژنول با دوزهای ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم. سپس پانکراس حیوانات خارج و بعد از طی مراحل تثبیت، آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی به روش H&E مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت. مطالعات بافتی پانکراس افزایش یاخته‌های التهابی، افزایش یاخته‌های نکروزی و افزایش جزایر تخریب شده را در گروه PCOS نشان داد. تجویز اوژنول ویژگی‌های بافتی پانکراس را بهبود بخشید. درمان با اوژنول با دوزهای ۱۲ یا ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور قابل توجهی تعداد یاخته‌های التهابی، یاخته‌های نکروزی و جزایر تخریب شده را کاهش داد (p<0.05). یافته‌ها نشان داد که اوژنول می‌تواند در بهبود بیماری PCOS و کاهش اثرات مخرب آن موثر باشد.

واژگان کلیدی: سندروم تخمدان پلی‌کیستیک، اوژنول، پانکراس، موش صحرایی تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۲۰

مقدمه

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (Polycystic Ovarian Syndrome:PCOS) شناخته شده‌ترین اختلال غدد

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- پژوهشگاه هورافسا، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران، ایران zahrahagebrahimi@yahoo.com

۳- گروه آناتومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

میخک (*Syzygium aromaticum*) است اوژنول مایعی شفاف تا زرد کم‌رنگ با قوام روغنی و رایحه‌ای تند است. کمی در آب حل می‌شود و در حلال‌های آلی به خوبی حل می‌شود. هم میخک و هم اوژنول نیز در عطر و صنایع طعم‌دهنده استفاده شده است (۵). در چند دهه اخیر مطالعات بسیاری نشان داده است که اوژنول دارای اثرات ضد درد (۶) ضد تومور (۷) ضد التهاب (۸) آنتی‌اکسیدانی (۹) ضد میکروبی (۱۰) و ... می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین اثر ماده مؤثره اوژنول بر بافت پانکراس در رت‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک انجام گرفت.

مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی، ۳۰ موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. حیوانات در خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در شرایط استاندارد آزمایشگاهی دمای ثابت 22°C و رطوبت با چرخه نور و تاریکی ۱۲ ساعت: ۱۲ ساعت نگهداری شدند. آنها دسترسی نامحدودی به رژیم غذایی و آب معمولی داشتند. از حیوانات مطابق با راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مراقبت می‌شد (۱۱).

تمامی پروتکل‌های شرح داده شده در اینجا توسط کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی (شماره مجوز اخلاقی: IR.IAU.SRB.REC.1396.51) تأیید شده است. تمام تلاش‌ها برای کاهش درد و تعداد حیوانات انجام شد. همه حیوانات به صورت هفتگی وزن شدند و تغییرات وزن بدن در طول آزمایش ثبت شد. برای آشنایی موش‌ها با محیط آزمایشگاه، حیوانات به مدت ۱۴ روز بدون مداخله در آزمایشگاه نگهداری شدند.

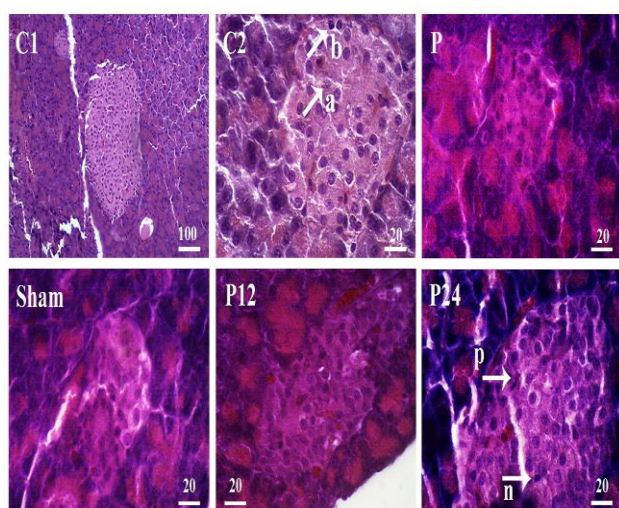
برای القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به مدت ۲۸ روز از تزریق داخل صفاقی تک دوز استرادیول والرات (۴ میلی-گرم، شرکت داروسازی ابوریحان، تهران، ایران) استفاده شد. برای تأیید القای PCOS، آنالیز بافت‌شناسی تخمدان‌ها و آنالیز هورمونی و بیوشیمیایی خون روی سه موش صحرایی انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه (هر گروه شامل ۶ موش) به شرح زیر تقسیم شدند:

- ۱- گروه کنترل (C) که رژیم غذایی معمولی دریافت کردند.
- ۲- گروه PCOS که رژیم غذایی معمولی دریافت کردند.
- ۳- گروه عمل شم: موش‌های صحرایی PCOS (به عنوان شاهد PCOS) که به مدت ۲۸ روز توئین (۸۰٪) به عنوان حلال اوژنول تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.
- ۴- گروه تجربی ۱۲ (EXP-12): موش‌های PCOS که به مدت ۲۸ روز اوژنول را با دوز ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (سیگما کیمیکال، سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.
- ۵- گروه تجربی ۲۴ (EXP-24): موش‌های PCOS که به مدت ۲۸ روز اوژنول را با دوز ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی

پس از بیهوشی و خون‌گیری از قلب، بافت پانکراس حیوان خارج و در فرمالدئید (۱۰٪) تثبیت شد، برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه بافت‌شناسی پس از آب‌گیری و پاک‌سازی با محلول‌های الکل و زایلن جهت قالب‌گیری از دستگاه تمام اتوماتیک Tissue processor (مدل TP1010، Leica آلمان) استفاده شد و برش‌هایی به قطر ۷ میکرومتر از نمونه‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و لام دائمی از نمونه‌ها برای مطالعات بافت-

یاخته‌های نکروزه و جزایر آسیب دیده در گروه‌های PCOS و شم نسبت به حیوانات شاهد افزایش یافت (شکل ۲). درمان با اوژنول بهبود قابل توجهی در اندازه جزایر و ساختار بافت‌شناسی همراه با کاهش یاخته‌های نکروزه، یاخته‌های التهابی و جزایر آسیب دیده در گروه‌های EXP12 و EXP24 در مقایسه با گروه‌های شم و PCOS نشان داد. همچنین انسجم بافتی نسبت به گروه PCOS و شم تا حدودی بهبود یافته است. اما عدم رنگ‌آمیزی یاخته‌ها در برخی از نواحی بافت مشاهده شد.



شکل ۱. تصویر از یک بخش در بافت پانکراس در همه گروه‌های حیوانی مطالعه شده با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E. a: یاخته‌های آلفا، b: یاخته‌های بتا، n: یاخته‌ها/جزایر نکروزه، p: هسته پیکنوز. نوار مقیاس در بخش C1 معادل ۱۰۰ میکرومتر و در بخش‌های C2، P، Sham، EXP12 و EXP24 معادل ۲۰ میکرومتر. C1 و C2: گروه کنترل، PCOS: حیوانات دارای سندرم تخمدان پلی کیستیک، Sham: حیوانات PCOS دریافت‌کننده توئین به عنوان حلال اوژنول به مدت ۴ هفته، EXP12 و EXP24: یوانات PCOS دریافت‌کننده اوژنول به میزان ۱۲mg/kg و ۲۴mg/kg (به ترتیب) به مدت ۴ هفته.

شناسی و مشاهده با میکروسکوپ نوری معمولی تهیه شد (۱۱).

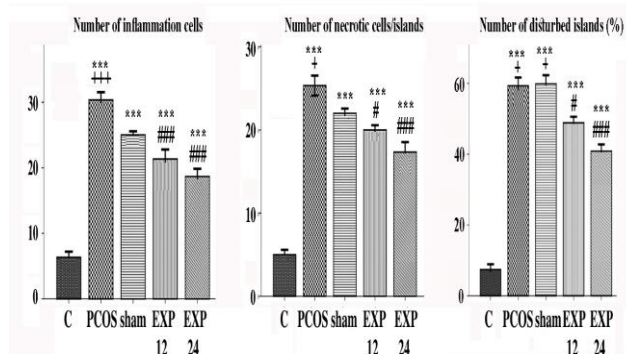
تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد. آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تست Tukey در آنالیز داده‌ها استفاده شد. نتایج در $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E}$ ارائه شد نمودارها توسط نرم‌افزار Excel ترسیم گردیدند.

نتایج

شکل ۱ برش عرضی بافت پانکراس موش صحرائی را نشان می‌دهد که با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ-آمیزی شده است. نمونه‌های موش‌های کنترل جزایر منظم و کاملاً مشخص را نشان دادند. جزایر به عنوان نواحی رنگ‌آمیزی ضعیف مشاهده شدند که توسط آسین‌های لوزالمعده محیطی بسیار شدید احاطه شده بودند. یاخته‌های آلفای ترشح‌کننده گلوکاگون غدد درون‌ریز با هسته‌های صورتی کم‌رنگ و یاخته‌های بتا ترشح‌کننده انسولین با هسته‌های یوکروماتین مشاهده شدند. اندازه جزایر در مقایسه با سایر گروه‌های PCOS بزرگتر بود. ناحیه برون‌ریز، آسینی منظم و پرشده با مورفولوژی و ساختار طبیعی را نشان داد. با توجه به نمونه‌های حیوانات شم و PCOS، میزان تراکم یاخته‌ای در جزایر و اندازه جزایر به طور معنی‌داری کاهش یافت و به طور آشکارا منقبض شده، کاهش یاخته‌ای (hypo cellular) با انقباض هسته‌ای و پیکنوز را نشان دادند. بیشتر یاخته‌های تخریب شده در مرکز جزایر دیده می‌شد. میزان تخریب یاخته‌های بتا ۶۰ درصد بود. انسجم بافتی کمتر بوده و در برخی نواحی عدم رنگ‌آمیزی در یاخته‌ها مشاهده می‌شود که به دلیل تغییر ساختار یاخته‌ها است. به طور کلی، تعداد یاخته‌های التهابی،

کردند و پس از ۲۸ روز مشاهده کردند که رت‌ها دچار PCOS شده‌اند (۱۳). زنان مبتلا به PCOS اغلب مقاومت به انسولین همراه با هیپرانسولینمی همراه را نشان می‌دهند و تمایل بیشتری به ابتلا به دیابت نوع ۲ را نشان می‌دهند. در حالی که تأثیر بیش از حد آندروژن بر حساسیت سیستمیک به انسولین به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است، توجه کمتری به ارزیابی تأثیر هیپرانسولینمی بر عملکرد سلول‌های β و آزادسازی انسولین شده است. با این حال، برخی شواهد نشان می‌دهند که بیش از حد آندروژن ممکن است به اختلال در تحمل گلوکز و عملکرد سلول‌های β در زنان مبتلا به PCOS کمک کند. با این حال، مکانیسم‌های زیربنای این اثر آندروژنیک روی پانکراس هنوز به خوبی شناخته نشده است (۱۴، ۱۵). Navarro و همکاران در سال ۲۰۱۸ به این نتیجه رسیدند که فعال شدن بیش از حد گیرنده‌های آندروژن در یاخته‌های β پانکراس ممکن است باعث افزایش عملکرد میتوکندری، آسیب اکسیداتیو و ترشح بیش از حد انسولین شود، اثراتی که ممکن است مستعد شکست یاخته‌های β باشد (۱۶). در زنان مبتلا به PCOS، مستند شد که استرس اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی در سلول‌های تک هسته‌ای (Mononuclear cells: MNC) و فعال‌سازی فاکتور هسته‌ای- κB (NF- κB) تحریک شده با گلوکز در این یاخته‌های ایمنی در اختلال عملکرد یاخته‌های β در PCOS نقش دارند و این نشان می‌دهد که هر دو استرس اکسیداتیو و فرآیندهای التهابی با شکست یاخته‌های β در این بیماران مرتبط است. همچنین مشخص شده است که آندروژن اضافی حساسیت MNC به گلوکز را افزایش می‌دهد در نتیجه استرس اکسیداتیو تحریک شده با گلوکز و آزاد شدن عوامل التهابی از MNC را تشدید می‌کند (۱۷). این نتایج نشان می‌دهد که آندروژن بیش از حد ممکن است اختلال عملکرد یاخته‌های β را در زنان مبتلا به PCOS از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیر



شکل ۲. تغییرات یاخته‌ای در بافت پانکراس در گروه مبتلا به PCOS و تحت درمان با اوژنول. C: گروه کنترل، PCOS: حیوانات دارای سندرم تخمدان پلی کیستیک، Sham: حیوانات PCOS دریافت کننده توئین به عنوان حلال اوژنول به مدت ۴ هفته، EXP12 و EXP24: یوانات PCOS دریافت کننده اوژنول به میزان ۱۲mg/kg و ۲۴mg/kg (به ترتیب) به مدت ۴ هفته. * اختلاف معنی دار با گروه کنترل، # اختلاف معنی دار با گروه PCOS + اختلاف معنی دار با گروه با دوز ۱۲mg/kg را نشان می‌دهد. #، * و $p \leq 0.05$ ، **، ### و $p \leq 0.01$ ++ و $p \leq 0.001$ +++ را نشان می‌دهد.

بحث

سندروم تخمدان پلی کیستیک یکی از بیماری‌های مهم زنان در سنین باروری بوده و درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد. اخیراً مطالعاتی در مورد درمان‌هایی بر پایه مواد مؤثره گیاهی بخصوص آنتی‌اکسیدان‌ها صورت گرفته است (۱۲). این مطالعه اثرات درمانی بالقوه اوژنول و بهبود تغییرات فیزیولوژیکی PCOS موش صحرائی را در برابر سمیت پانکراس ناشی از استرادیول والرات گزارش کرد. در پژوهش حاضر، فنوتیپ سندروم تخمدان پلی کیستیک توسط استرادیول-والرات در مدل حیوانی ایجاد شد و اثرات درمانی بالقوه اوژنول به عنوان ماده مؤثره گیاه *Syzygium aromaticum* و همچنین یک ترکیب آنتی-اکسیدانی در درمان این سندروم بررسی شد. در پژوهش‌های دیگری، برای القاء PCOS در رت‌ها از تزریق داخل صفاقی استرادیول والرات به میزان ۴ میلی‌گرم استفاده

تواند باینگر اثرات ضد دیابتی اوژنول باشد. مطالعه قبلی ما نشان داد که مصرف اوژنول در موش های PCOS موجب بهبود گلوکز و انسولین می شود و همچنین موجب کاهش استرس اکسیداتیو می گردد (۱۸). استرس اکسیداتیو و التهاب دو عامل مهم و کلیدی برای بیماری دیابت و آسیب بافت پانکراس می باشد. بنابراین این احتمال وجود دارد که اثرات مفید اوژنول در مطالعه حاضر بر بافت پانکراس و بهبود آن ناشی از خواص آنتی اکسیدانسی، ضد التهابی و ضد دیابتی آن باشد. در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر و هیستوپاتولوژیک نشان داد اوژنول احتمالا می تواند سبب بهبود تظاهرات بیماری سندرم تخمدان پلی کیستیک شود و با توجه به اینکه بیماری سندرم تخمدان پلی کیستیک یکی از انواع بیماری های التهابی و ناشی از استرس اکسیداتیو است امید است بتواند سبب بهبود این بیماری آلزایمر گردد.

فهرست منابع

1. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr Rev.* 2016; 37(5):467-520.
2. Paschou SA, Palioura E, Ioannidis D, Anagnostis P, Panagiotakou A, Loi V, Karageorgos G, Goulis DG, Vryonidou A. Adrenal hyperandrogenism does not deteriorate insulin resistance and lipid profile in women with PCOS. *Endocr Connect.* 2017; 6(8):601-606 .

مستقیم افزایش دهد. با این حال، تجزیه و تحلیل های تجربی اضافی برای کشف مکانیسم های اساسی مرتبط مورد نیاز است. در مطالعه قبلی ما نیز مشخص شد که در موش های صحرایی دارای سندروم PCOS میزان انسولین و گلوکز خون به میزان معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است (۱۸).

سندرم تخمدان پلی کیستیک با افزایش اینترلوکین-18 (IL-18) مرتبط است. IL-18 یک سایتوکین پیش التهابی است که متعلق به ابرخانواده IL-1 است و ارتباط نزدیکی با مقاومت به انسولین، سندرم متابولیک دارد و یک پیش بینی کننده مهم مرگ و میر قلبی عروقی طولانی مدت است. غلظت آن در بیماران سندرم تخمدان پلی کیستیک بدون توجه به وجود مقاومت به انسولین و چاقی افزایش می یابد، با این حال، زنان چاق مبتلا به هیپرانسولینمی حتی غلظت بالاتری از IL-18 دارند (۱۹). در چند دهه اخیر مطالعات بسیاری نشان داده است که اوژنول دارای اثرات ضد درد (۶) ضد تومور (۷) ضد التهاب (۸) آنتی اکسیدانی (۹) ضد میکروبی (۱۰) و ... می باشد. اوژنول قادر به مقاومت در برابر انتشار واسطه های پیش التهابی مانند اینترلوکین β_1 ، فاکتور نکروز تومور- α و پروستاگلاندین E2 از ماکروفاژها است و بنابراین به عنوان یک عامل ضد التهابی مفید است (۲۰). یافته های بافت شناسی بر اساس داده های به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که اوژنول باعث بهبود اندازه جزایر و کاهش تعداد سلول های نکروز، سلول های التهابی و جزایر مختل در نمونه های پانکراس حیوانات تحت درمان در مقایسه با موش های بدون درمان شد. کاهش یاخته های التهابی در بافت پانکراس حیوانات EXP12 و EXP24 بر خواص ضد التهابی اوژنول تأکید می کند. همچنین این یافته ها می

3. Ye W, Xie T, Song Y, Zhou L. The role of androgen and its related signals in PCOS. *J Cell Mol Med.* 2021; 25:1825–1837.
4. Tammannavar P, Pushpalatha C, Jain S, Sowmya SV. An unexpected positive hypersensitive reaction to eugenol. *Case Rep.* 2013;2013: bcr2013009464.
5. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research.* 2007; 21:501-506.
6. Cho JS, Kim TH, Lim J-M, Song J-H. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain research.* 2008;1243:53-62.
7. Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, Vinothini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life sciences.* 2010;86(25):936-41.
8. Fonsêca DV, Salgado PR, Neto HdCA, Golzio AM, Caldas Filho MR, Melo CG, et al. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *Int immunopharmacol.* 2016;38:402-8.
9. Fathy M, Fawzy MA, Hintzsche H, Nikaido T, Dandekar T, Othman EM. Eugenol exerts apoptotic effect and modulates the sensitivity of HeLa cells to cisplatin and radiation. *Molecules.* 2019; 24:3979.
10. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol.* 2006;111:170–174.
11. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. *Guide for the care and use of laboratory animals.* Washington: National Academy Press. 1996.
12. Al-kataan MA., Ibrahim M.A., Al-jammas M.H.H., Shareef Y.S., Sulaiman M.A. 2010. Serum Antioxidant Vitamins Changes in Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Journal of the Bahrain.Medical Society,* 22(2):68-71.
13. Pahlevani P, Mosavi SM, Rastgoo Haghi AR, Lahotian H, Esna Ashari F, Alizadeh Z. Study of the effects of stachys *lvandulifolia* alcoholic extract on histomorphometry of endometrium in polycystic ovarian syndrome rat model. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences.* 2015; 20(3): 40-48.
14. Zhang B, Wang J, Shen S, Liu J, Sun J, Gu T. Association of androgen excess with glucose intolerance in women with polycystic ovary syndrome. *BioMed Research Int.* 2018; 2018:6869705.
15. Xu W, Morford J, Mauvais-Jarvis F. Emerging role of testosterone in pancreatic beta cell function and insulin secretion. *J Endocrinol.* 2019; JOE-18-0573.
16. Navarro G, Allard C, Morford JJ, Xu W, Liu S, Molinas AJ. Androgen excess in pancreatic beta cells and neurons predisposes female mice to type 2 diabetes. *JCI Insight.* 2018;3(12): e98607.
17. C Malin SK, Kirwan JP, Sia CL, Gonzalez F. Pancreatic beta cell dysfunction in polycystic ovary syndrome: role of hyperglycemia-induced nuclear factor-kappa B activation and systemic inflammation. *American Journal of Physiology. Endocrinol Metabol.* 2015; 308(9):E770–E777.
18. Kokabiyan Z, Yaghmaei P, Behnamedin Jameie S, Hajebrahimi Z (2022) Therapeutic effects of eugenol in polycystic ovarian rats induced by estradiol valerate: a histopathological and a biochemical study. *Int J Fertil Steril.* 2022; 16(3):184-91.
19. Kaya C, Pabuccu R, Berker B. Plasma interleukin-18 levels are increased in the polycystic ovary syndrome: Relationship of carotid intima-media wall thickness and cardiovascular risk factors. *Fertil Steril.* 2010; 93:1200–1207.
20. Garg D, Merhi Z. Relationship between advanced glycation end products and steroidogenesis in PCOS. *Rep Biol Endocrinol.* 2016;14:71.