

مقاله پژوهشی

اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر بافت تخمدان و هورمون‌های جنسی موش‌های مدل POF

کیانا قربانی^۱، سیده فاطمه سیادت^{۲*}، روح‌الله فتحی^۳، فاطمه عابدی^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: fsiadat2003@yahoo.com

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲

چکیده

نارسایی زودرس تخمدان (POF) به عنوان یک اختلال هتروژن که به آمنوره و نارسایی تخمدان قبل از سن ۴۰ سال منجر می‌شود، شناخته شده و باعث ناباروری در زنان جوان می‌شود. گیاه پنج انگشت به طور سنتی برای درمان مشکلات هورمونی زنان استفاده می‌شود. این مطالعه جهت بررسی اولیه اثر عصاره میوه این گیاه بر عملکرد تخمدان و وزن بدن موش بعد از القای POF در موش‌ها انجام گردید. در این مطالعه ۵۰ سر موش به پنج گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل، POF و سه گروه تجربی (ایجاد مدل POF و گاواژ عصاره گیاه پنج انگشت) تقسیم شدند. بعد از تأثیر عصاره، بافت تخمدان با رنگامیزی هماتوکسیلین - اتوزین مورد مطالعه قرار گرفت و شمارش فولیکولی و بررسی سطح سرمی انجام گردید. نتایج نشان داد تعداد فولیکول‌ها، جسم زرد، و وزن بدن موش‌ها در گروه POF کاهش معناداری داشتند. همچنین سطح سرمی هورمون‌های FSH نیز در گروه POF افزایش و هورمون E2 کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشتند ($p < 0.05$) که نشان دهنده ایجاد درست مدل POF است. بعد از خوراندن عصاره گیاه پنج انگشت در مدل‌های موشی POF شده سطح سرمی هورمون‌ها تعدیل و افزایش در تعداد فولیکول‌های تخمدانی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که داروی سیکلوفسفامید می‌تواند مدل POF را به خوبی در موش القا کند و عصاره گیاه پنج انگشت اثرات مثبتی بر وضعیت فولیکول‌ها، وزن بدن و هورمون‌های جنسی موش دارد.

کلیدواژه‌ها: نارسایی زودرس تخمدان، گیاه پنج انگشت، تخمدان، سیکلوفسفامید.

مقدمه

زنان زیر ۴۰ سال و ۰/۱ درصد زنان زیر ۳۰ سال را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ویژگی‌های POF شامل آمنوره هیپوستروژنیسم و سطوح بالای گنادوتروپین در زنان زیر ۴۰ سال است. علل این بیماری تا حد زیادی ناشناخته هستند. زنان مبتلا به POF علائم

نارسایی زودرس تخمدان (POF^۱) که به عنوان یانسگی زودرس نیز شناخته می‌شود، یک بیماری شایع است که ۱ تا ۲ درصد از

^۱ Premature ovarian failure

توجه به کاهش هورمون‌های استروئیدی در زنان یائسه، شرایط جسمی متفاوتی به خاطر علائم یائسگی دارند که به کارکرد جنسی آنان تاثیرگذار است و فیتواستروژن‌ها با رفع این مشکلات می‌توانند کارکرد جنسی این گروه را بهبود ببخشند [۲۰]. در تحقیق حاضر هدف، بررسی پتانسیل داروی سیکلوفسفامید به عنوان داروی ایجاد کننده مدل موشی POF و اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر روی هورمون‌های جنسی و بافت تخمدان موش‌هایی است که به طور مصنوعی دچار POF شده‌اند (مدل POF).

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی و بر روی ۵۰ سر موش بالغ ماده نژاد NMRI (سن ۸ تا ۱۰ هفته و با میانگین وزنی 25 ± 5 گرم) در ۵ گروه ۱۰ تایی انجام گردید. موش‌ها در آزمایشگاه بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم و تحقیقات با شرایط نگهداری مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. سیکل جنسی موش‌ها با تهیه اسمیر واژنی تعیین شده و موش‌هایی که سیکل منظمی داشتند برای کار انتخاب شدند. موش‌ها به پنج گروه تقسیم شدند. گروه کنترل، تحت هیچ درمانی قرار نگرفتند و فقط آب و غذا دریافت کردند. گروه POF، به مدت ۱۲ روز داروی شیمی درمانی سیکلوفسفامید (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت تزریقی دریافت کردند و سه گروه تجربی. که ابتدا با تزریق سیکلوفسفامید مدل POF در آنها القا شد، سپس سه دوز از عصاره گیاه پنج انگشت (۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به آنها خوراندند (گاواژ) شد.

تهیه عصاره گیاهی

برای تهیه عصاره گیاه از میوه خشک شده گیاه پنج انگشت استفاده شد. میوه آسیاب شده داخل مخزن ریخته و سپس حلال هیدروالکلی ۸۰٪ اتانولی را به شکلی که روی پودر را کاملاً بپوشاند ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت به طور مرتب میکس شد و سپس مخلوط گیاه و عصاره را صاف و عصاره به دست آمده برای استفاده مجدداً فیلتر شد و این کار یک بار دیگر نیز بر روی پودر خیس شده گیاه انجام شد. عصاره جمع‌آوری و توسط دستگاه روتاری بخش اعظم حلال آن تبخیر شد و مابقی عصاره

یائسگی مانند گرگرفتگی، عرق شبانه و خشکی واژن را تجربه می‌کنند که مشابه با یائسگی طبیعی است. بسیاری از اختلالات که سلامتی و رفاه ما را تحت تاثیر قرار می‌دهند، اغلب پایه‌ی ژنتیکی دارند [۱]. علاوه بر وراثت [۲، ۳]، علل اتوایمیون [۴]، تخریب فولیکول‌ها در پی عفونت، عوامل ایاتروژنیک [۵]، سابقه هیستروکتومی و عوامل محیطی مانند شیوه زندگی، مصرف سیگار و ارتفاع از سایر عوامل دخیل در ایجاد POF معرفی شده‌اند. نارسایی زودرس تخمدان POF یک اختلال هتروژن است که به عنوان توقف عملکرد تخمدانی، همراه با افزایش هورمون تحریک‌کننده فولیکول (FSH) و کاهش سطح استروژن (E_2) در زنان زیر ۴۰ سال تعریف می‌شود. آتروفی تخمدان، کاهش ذخایر فولیکول، اختلالات سیکل قاعدگی و اختلال عملکرد تخمدان از مهم‌ترین ویژگی‌های POF است [۶]. گیاه ویتکس^۱ یا درخت عقیقه^۲ از خانواده شاه پسند یکی از مهمترین گیاهانی است که اثرات مفید آن در درمان برخی از بیماری‌های زنان گزارش شده است [۷]. این گیاه بومی نواحی مرکزی آسیا بوده که امروزه پراکندگی فراوانی در نقاط جنوبی و گرم اروپا، منطقه مدیترانه، مناطق گرم ایالات متحده و نواحی دیگر دارد [۸]. این گیاه به طور سنتی برای درمان بی‌نظمی‌های قاعدگی و به طور خاص برای کمک به ایجاد سیکل طبیعی قاعدگی و همچنین بهبود باروری استفاده می‌شده است [۹]. گیاه پنج انگشت محتوی هورمون نیست، ولی با اثر بر غده هیپوفیز، بویژه بر تنظیم ترشح هورمون LH فعالیت هورمونی نشان می‌دهد [۱۰]. در مطالعات انسانی اثربخشی گیاه پنج انگشت در درمان بسیاری از بیماری‌های زنان همچون سندرم پیش از قاعدگی [۱۱]، خونریزی نامنظم قاعدگی، هایپرولاکتیمی، دیسمینوره و بهبود علائم یائسگی [۱۲] مشاهده شده و بی‌خطر و قابل تحمل بودن آن در نمونه انسانی در مطالعات گزارش شده است [۱۳، ۱۴] عقیده بر این است که فلاونیدها و ساپونین با افزایش آزادسازی نیتریک اکساید و اندوتلیوم منوفسفات حلقوی [۱۵، ۱۶] باعث افزایش خون رسانی، بهبود کارکرد سیستم تناسلی، افزایش LH و افزایش تستوسترون می‌گردد [۱۷]. مطالعات اندکی در زمینه تاثیر پنج انگشت بر کارکرد جنسی در زنان یائسه انجام شده است [۱۸]، اما هنوز اثر بخشی آن در سنین باروری نامعلوم است. با

¹ Vitex agnus castus

² Chaste tree

آبگیری قرار گرفته و به وسیله پارافین مایع قالب گیری شدند. سپس قالب‌های بافت تخمدان با ضخامت ۵ میکرومتر برش زده و روی لام قرار داده شد. قطعات بافت تخمدان با روش هماتوکسلین ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شده و ساختار و تعداد فولیکول‌ها زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. برای جلوگیری از شمارش فولیکول بیش از یک بار، مشاهده هسته تخمک در هر فولیکول به عنوان شاخص شمارش در نظر گرفته شد. برای بررسی مورفولوژی فولیکول‌ها از بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰، همچنین برای شمارش فولیکول‌ها از بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد. فولیکول‌هایی سالم در نظر گرفته شدند که دارای سلول‌های گرانولوزای فعال و رنگ پذیری طبیعی بودند و به صورت فشرده در کنار هم قرار گرفته و به تخمک با سیتوپلاسم شفاف، اتصال داشتند و به ندرت سلول‌های گرانولوزای جدا شده با هسته پیکنوتیک در آنها دیده می‌شد. فولیکول‌هایی مرده در نظر گرفته شدند که سیتوپلاسم تخمک تیره و چروکیده شده و سلول‌های گرانولوزای آنها دارای هسته‌های پیکنوتیک بودند. فولیکول‌های تخمدان بدین ترتیب طبقه‌بندی شدند: فولیکول بدوی که تخمک در آن فاقد زوناپلوسیدا و توسط یک لایه سلول‌های پهن سنگفرشی احاطه شده بود فولیکول پرایمری، تخمک به وسیله یک لایه از سلول‌های گرانولوزای مکعبی شکل احاطه شده بود. در فولیکول پرترال، تخمک‌ها به وسیله دو یا چند لایه از سلول‌های گرانولوزا احاطه شده بودند و در مورد فولیکول آنترال تخمک‌ها به وسیله دو لایه یا بیشتر از سلول‌های گرانولوزا همراه با حفره آنتروم احاطه شده بودند.

اندازه گیری هورمون استرادیول و FSH

پس از اتمام تزریق و تیمار، حیوانات بیهوش شده و خونگیری از قلب به منظور تهیه سرم و اندازه گیری هورمون‌های استرادیول و FSH انجام شد. خون را داخل لوله آزمایش ریخته و مدت ۲۰ دقیقه داخل دستگاه سانتریفیوژ قرار داده و سپس سرم جدا شده را به میکروتیوپ انتقال داده و آن را داخل فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی هورمونی قرار داده شد. اندازه گیری هورمونی بر اساس روش‌های معمول آزمایشگاهی یعنی با استفاده از روش RIA^۱ انجام گرفت.

درون ظرفی ریخته و زیر هود و محیطی عاری از میکروب قرار داده شد تا حلال کاملاً تبخیر شود و عصاره خشک شده باقی بماند.

ایجاد مدل موشی POF

برای ایجاد مدل POF به مدت ۱۲ روز دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از داروی سیکلوفسفامید (CTX) به موش‌ها تزریق گردید. برای اطمینان از تشکیل مدل POF چرخه استروس آن‌ها بررسی شد و همچنین خون گیری از قلب انجام شد و ارزیابی هورمون انجام گردید [۲۱]. بعد از تایید انجام شدن مدل POF، موش‌های گروه تجربی به سه گروه تقسیم شدند و به گروه اول دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و به گروه دوم دوز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و به گروه سوم دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گیاه پنج انگشت خورانده شد.

خونگیری از قلب

خون گیری از قلب طبق روش آسپیره کردن از ناحیه قفسه سینه انجام شد. با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی سرم صورت گرفت و برای ارزیابی‌های هورمونی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه نمونه اسمیر از واژن موش

قبل از تزریق داروی شیمی درمانی اسمیر واژن از حیوانات گرفته شد. به این ترتیب که به کمک سر سمپلر استریل، ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین ۰/۹% به داخل واژن موش‌ها به آرامی تزریق و بعد از سه بار پیپتاژ، نمونه‌ها روی لام قرار داده شد و لامل روی آن‌ها قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. چرخه استروس در موش‌ها ۴ تا ۵ روز به طول می‌انجامد و شامل ۴ مرحله پرواستروس، استروس، مت استروس، دی استروس هستند. چرخه تولید مثلی هر موش به صورت روزانه قبل و بعد از تزریق مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی‌های بافت شناسی

برای بررسی بافتی، تخمدان‌ها در همه گروه‌ها، در محلول فرمالدئید ۴% تثبیت شدند و طی فرآیند بافت‌شناسی، تحت

^۱ Radio Imuno assay

آنالیز آماری

درصد فولیکولهای آرتیک کاهش معناداری نسبت به گروه POF داشتند (شکل ۱) (نمودار ۲).

ارزیابی هورمون‌های استرادیول و FSH:

نتایج حاصل از ارزیابی هورمون استرادیول در گروه POF نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته و دوز ۳۰۰ و ۱۰۰ از گیاه میزان E₂ سرم تفاوتی با گروه POF نکرده است اما دوز ۵۰۰ از گیاه پنج انگشت افزایش میزان E₂ سرم را نسبت به گروه POF را مشاهده می‌کنیم ($P \leq 0/05$). همچنین میزان هورمون FSH در گروه POF نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشته و در دوز ۱۰۰ از گیاه میزان FSH سرم تفاوتی با گروه POF نداشت اما با گاوژ دوز ۳۰۰ و ۵۰۰ از گیاه پنج انگشت، در میزان FSH سرم نسبت به گروه POF کاهش معنی‌داری ($P \leq 0/05$) مشاهده شد (نمودار ۳).

بحث

پیشرفت‌های زیادی در زمینه درمان سرطان صورت گرفته است در حالی که ظهور عوامل شیمی‌درمانی امید به زندگی بیمارانی که با سرطان سر و کار دارند را افزایش داده است [۲۲]. از سوی دیگر، آسیب ناشی از شیمی‌درمانی به تخمدان نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده است زیرا اثرات جانبی پرتو درمانی یا شیمی‌درمانی بر روی سلول‌های تخمدان عموماً غیرقابل برگشت هستند [۲۳]. بعضی از درمان‌های موجود برای بیماران مبتلا به سرطان، مثل شیمی‌درمانی می‌تواند ذخیره تخمدانی را از بین ببرد، بنابراین منجر به نارسایی تخمدان و ناباروری می‌شود [۲۴]. زمانی که سلول‌های تخمدانی در معرض سیکلوفسفامید قرار می‌گیرند، آپوپتوزیز به عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در از دست دادن فولیکول در نظر گرفته می‌شود [۲۵]. مطالعات پیشنهاد می‌کنند که سیکلوفسفامید قادر به القای آپوپتوز از طریق تولید بیش از حد ROS و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های تخمدان است و آن‌ها را تحریک می‌کند تا تحت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول قرار بگیرند [۲۴]. سیکلوفسفامید موجب نابودی فولیکول‌های مقدماتی شده و به علت کاهش ذخیره فولیکولی، تأثیر منفی روی سیستم تولید مثلی داشته و موجب ناباروری و یائسگی زودرس در جنس ماده می‌شود، می‌شود [۲۶]. تحقیقات آزمایشگاهی نشان

محاسبات آماری برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تجربی و کنترل با استفاده از آزمون (ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام گرفت. مرز استنتاج آماری نتایج $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد. نمودارها بر اساس اطلاعات حاصله با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

یافته‌ها

یافته‌های بررسی تغییرات وزن موش قبل و بعد از تزریق داروهای شیمی‌درمانی

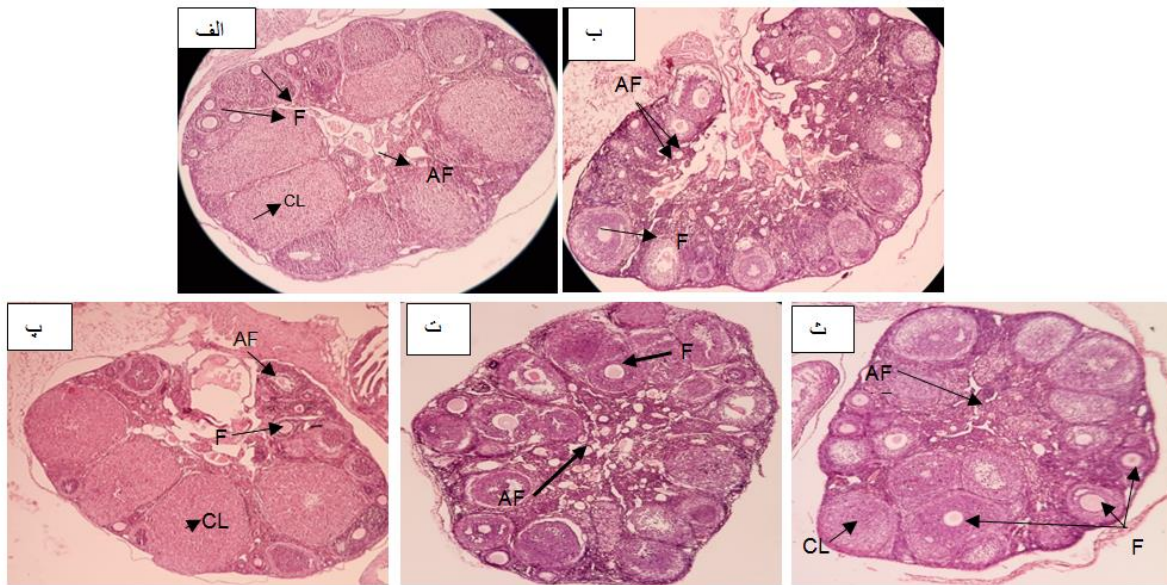
وزن موش‌های گروه POF نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است و گاوژ گیاه پنج انگشت در دوزهای (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به موش‌های تجربی باعث افزایش وزن نسبت به گروه POF شده است هرچند که این افزایش وزن نسبت به گروه کنترل کمتر است ($P \leq 0/05$) (نمودار ۱).

بررسی چرخه استروس

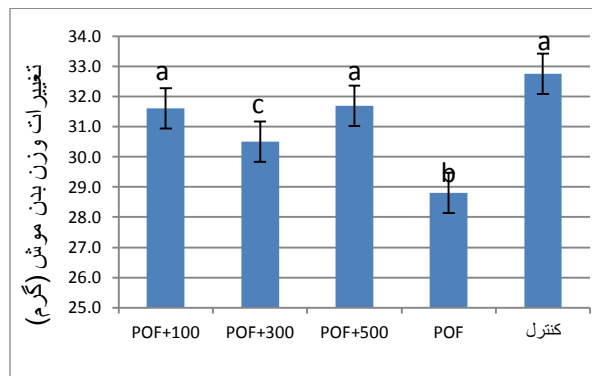
چرخه استروس موش‌ها قبل و بعد از تزریق سیکلوفسفامید بررسی شد. قبل از تزریق چرخه استروس کامل و منظم و هر چهار مرحله مشاهده شد. بعد از تزریق، چرخه استروس نامنظم مشاهده شد و مرحله استروس و پرواستروس طولانی‌تر شدند.

ارزیابی بافت تخمدان

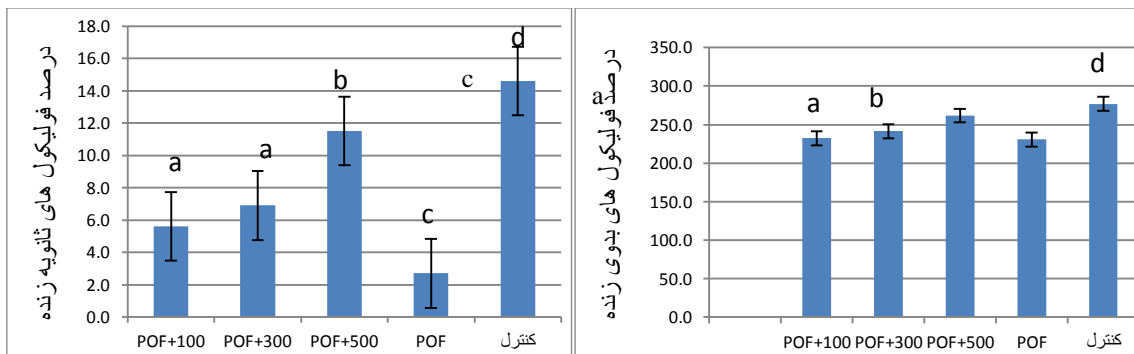
فولیکول‌های زنده و مرده در مراحل مختلف رشد و نمو هر گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از شمارش فولیکول‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار ($P \leq 0/05$) ذخیره کل فولیکول‌ها در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل بود، بدین ترتیب که تعداد فولیکول بدوی، فولیکول ثانویه، فولیکول آنترال و فولیکول گرآف، در گروه POF کاهش معنادار ($P \leq 0/05$) نسبت به گروه کنترل داشت و درصد فولیکول‌های آرتیک افزایش داشتند. تمام دوزهای استفاده شده گیاه پنج انگشت باعث افزایش تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه POF شده است اما در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، تعداد فولیکول‌های زنده و سالم نسبت به دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه POF داشتند، همچنین در این دوز

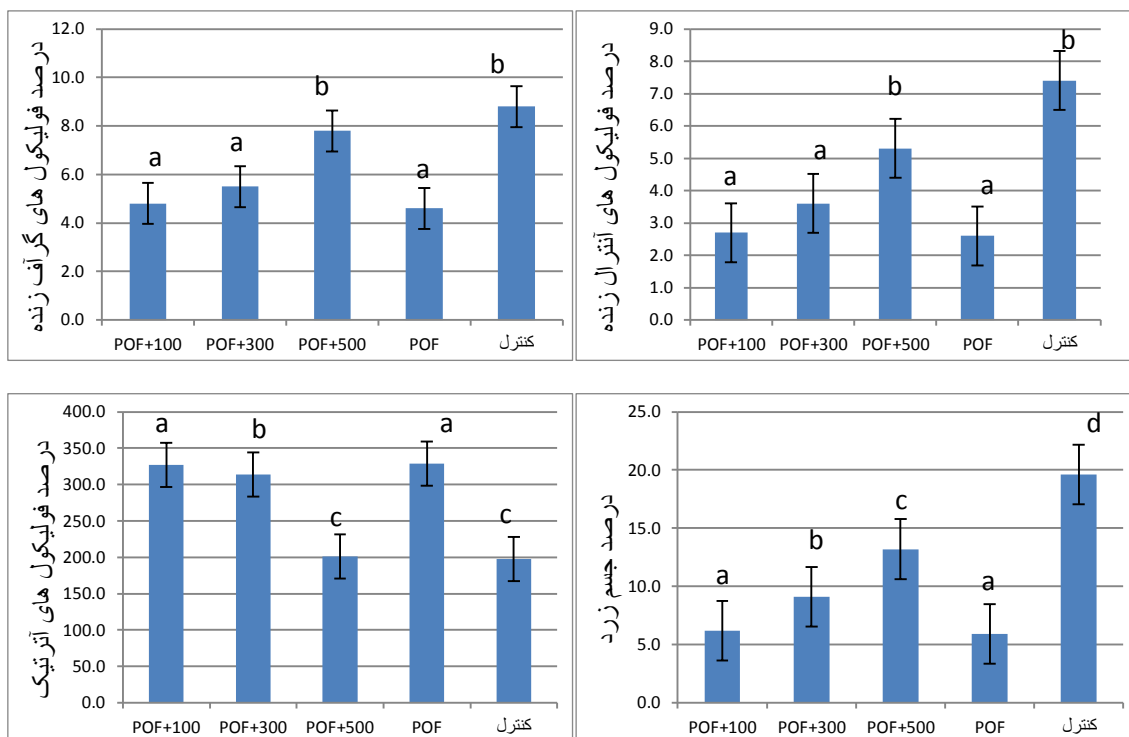


شکل ۱: ارزیابی مورفولوژیکی بافت تخدان با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین، الف) گروه کنترل، ب) گروه اول: تزریق دوز ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم سیکلوفسفامید به مدت ۱۲ روز و القاء مدل POF، پ) گروه دوم: موش های POF شده و درمان شده با دوز ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم گیاه پنج انگشت، ت) موش های POF شده و درمان شده با دوز ۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم گیاه پنج انگشت، ث) موش های POF شده و درمان شده با دوز ۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم گیاه پنج انگشت. فولیکول (F)، فولیکول تحلیل یافته (AF)، جسم زرد (CL).

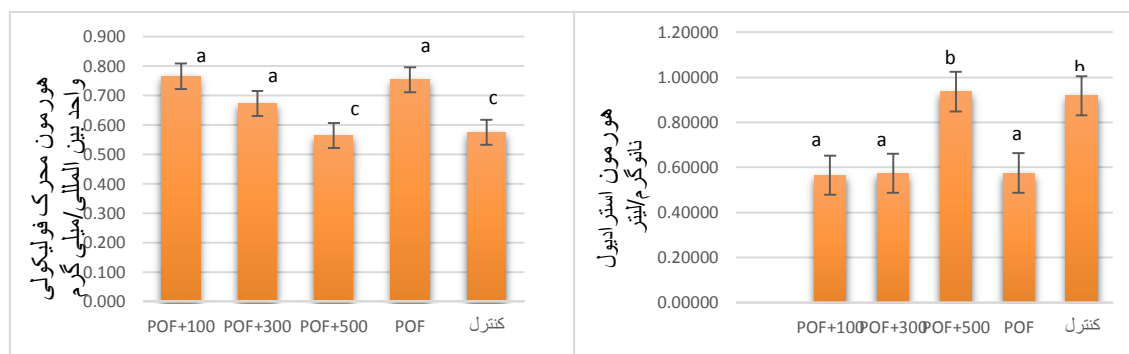


نمودار ۱: مقایسه میانگین تغییرات وزن بدن موش
حروف نامتشابه نشانگر اختلاف معنی دار است





نمودار ۲: تاثیر داروی سیکلوفسفامید و گیاه پنج انگشت روی مراحل مختلف رشد فولیکول‌ها. انواع فولیکول‌ها در تمام گروه‌ها شمارش شدند و به گروه‌های مختلف فولیکول بدوی، پرایمری، پراآنترال، آنترال، جسم زرد طبقه بندی شدند. گروه ۱: دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/گیاه پنج انگشت. گروه ۲: دوز ۳۰۰ میلی‌گرم/گیاه پنج انگشت. گروه ۳: دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/گیاه پنج انگشت. گروه ۴: تزریق ۱۰۰ میلی‌گرم سیکلوفسفامید. گروه ۵: گروه کنترل. حروف نامتشابه بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار (P<0/05) بین گروه‌ها را نشان می‌دهند.



نمودار ۳: نتایج تاثیر داروی سیکلوفسفامید (بعد از دوازده روز تزریق) و گیاه پنج انگشت بر ترشح هورمون‌های استرادیول و FSH در گروه‌ها. حروف نامتشابه بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار (P<0/05) بین گروه‌ها را نشان می‌دهند.

از نظر تعداد فولیکول‌ها در سایر مراحل بین گروه CTX و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است [۶] مطالعات چن و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان داد که، تخمدان‌ها بیشتر از اووسیت‌های تخریب شده و تعداد فولیکول‌های کاهش یافته، به ویژه فولیکول‌های اولیه در تخمدان‌های تحت درمان با CTX تشکیل شده بودند [۲۸]. نارسایی تخمدان با اندازه گیری سطح هورمون در خون تشخیص داده می‌شود و از لحاظ بیوشیمیایی با سطح پایین استروژن و سطح بالای FSH مشخص می‌شود [۲۹]

داده است که اثر سیکلوفسفامید در جنس ماده و توان باروری آن به زمان و مرحله رشد فولیکول‌ها بستگی دارد و با توجه به اینکه مدت زمان رشد و تکامل یک فولیکول در موش سوری حدوداً سه هفته طول می‌کشد، فولیکول‌هایی که در مرحله پیش حفره‌ای و یا حفره‌ای در معرض سیکلوفسفامید واقع می‌شوند، چگونگی تحلیل رفتن آنها متفاوت می‌باشد [۲۷]. نتایج دن سانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان داد که تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه درمانی CTX به طور معنی‌داری کاهش یافته است، اما

افزایش و هورمون E_2 در گروه درمانی CTX در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. در تایید مطالعات انجام گرفته در این تحقیق که بر روی تخمدان موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ انجام شد مشاهده گردید که انواع فولیکول‌ها در موش‌هایی که تحت شیمی درمانی با سیکلوفسفامید بدون مکمل آنتی‌اکسیدانتی قرار گرفته بودند کاهش چشمگیری نشان دادند. تاثیر سیکلوفسفامید بر روی انواع فولیکول‌های تخمدانی بالا بوده و تا حد زیادی تعداد این فولیکول‌ها را کاهش داد. همچنین سیکلوفسفامید بر میزان تخمک گذاری و تشکیل جسم زرد اثر گذاشته و باعث کاهش معنی دار آن در مقایسه با گروه کنترل شد و سبب افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک در مراحل مختلف رشد نسبت به گروه کنترل گردید ($p < 0/05$). برای تایید آشفستگی و بی‌نظمی چرخه جنسی موش، اسمیر واژینال تهیه شد و مشاهده شد هنگام تزریق سیکلوفسفامید چرخه استروس موش کاملاً نامنظم و آشفته می‌شود. مطالعات ما نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث بهبود فولیکول‌ها و تخمدان‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید می‌شود و همچنین سطح سرمی هورمون FSH افزایش و E_2 هنگام استفاده از گیاه پنج انگشت (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) کاهش می‌یابد و به گروه کنترل نزدیک می‌شود. وزن موش نیز هنگام آزمایش به طور مرتب اندازه‌گیری شد و نتیجه نشان داد که هنگام تزریق سیکلوفسفامید وزن بدن موش‌ها کاهش می‌یابد و در درمان با عصاره گیاه پنج انگشت (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) وزن موش‌ها بهبود پیدا می‌کند و به گروه کنترل نزدیک تر می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش حاکی از آن است که داروی سیکلوفسفامید به خوبی مدل موشی POF را القا می‌کند و در بالاترین دوز گیاه پنج انگشت تعدیل هورمون‌های جنسی و افزایش تعداد فولیکول‌ها و افزایش وزن موش‌ها مشاهده می‌گردد. به نظر می‌رسد بررسی‌های مولکولی و هورمونی بیشتر و همچنین بیان ژن بهتر می‌تواند اثرات این گیاه را در درمان POF نشان دهد.

تقدیر و تشکر

از آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و

این هورمون‌ها شاخص‌های اولیه و مهم برای تشخیص نارسایی زودرس تخمدان هستند [۳۰]. البته سطح و میزان هورمون در خون بسیار حائز اهمیت بوده، همچنین نوع و غلظت داروی شیمی درمانی مورد استفاده نیز در میزان شدت اختلال موثر است. گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) از خانواده شاه پسند یکی از مهمترین گیاهانی است که اثرات مفید آن در درمان برخی از بیماری‌های زنان گزارش شده است [۷]. اسید لینولئیک جدا شده از عصاره میوه این گیاه می‌تواند به گیرنده‌های استروژن متصل و عملکرد شبیه به استروژن ایجاد کند از سوی دیگر به گیرنده‌های دوپامینی متصل و سطح پرولاکتین را کاهش می‌دهد [۳۱، ۳۲]. گیاه پنج انگشت سبب افزایش تعداد فولیکول‌های پری آترتال، آترتال و جسم زرد، کاهش تعداد فولیکول‌های کیستی، کاهش ضخامت تونیکا آلبوژینای تخمدان، کاهش ضخامت لایه تکا و افزایش ضخامت لایه گرانولوزا در فولیکول‌های آترتال می‌شود [۳۳]. عصاره گیاه پنج انگشت در کاهش علائم سندروم پیش قاعدگی موثر است [۳۴] و از سقط جنین جلوگیری می‌کند و دارای اثرات مهمی در دوران مختلف بارداری بر تکامل جنین در حیواناتی نظیر موش (افزایش وزن و رشد) می‌باشد [۳۵]. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر گیاه پنج انگشت بر بافت تخمدان و میزان هورمون‌ها در مدل‌های موشی POF بررسی شد و نتایج ما نشان داد که این گیاه سطح هورمون‌های سرم را تغییر می‌دهد. تا کنون مطالعه‌ای که تاثیر این گیاه را بر بیماری POF بررسی کند انجام نشده است. البته اثر این گیاه بر PCOS [۳۶] مورد بررسی قرار گرفته است و نشان می‌دهد که در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل، FSH، سطح پروژسترون و استرادیول کاهش یافته، در حالی که سطح تستوسترون و LH به طور قابل توجهی افزایش یافته است. درمان با گیاه پنج انگشت در گروه PCOS، منجر به افزایش سطح پروژسترون، استروژن و FSH و کاهش سطح تستوسترون و LH شده است. در سندروم تخمدان پلی کیستیک ترشح هورمون‌های جنسی دچار اختلال شده است که باعث عدم تخمک گذاری و اختلال در باروری می‌شود و درمان با گیاه پنج انگشت در این سندروم باعث تعادل هورمون‌های جنسی و بهبود در بارداری شده است [۳۷]. مطالعات ما نشان داد که درمان با CTX سطح هورمون‌های سرم را تغییر می‌دهد. سطح سرمی هورمون FSH

- Gynecology and Infertility, 2019. **21**(12): p. 1-10.
- [13] Rani, A. and A. Sharma, *The genus Vitex: a review. Pharmacogn rev* 7: 188-198. 2013.
- [14] van Die, M.D., et al., *Vitex agnus-castus extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials. Planta medica*, 2013. **79**(07): p. 562-575.
- [15] Heuzé-Joubert, I., et al., *Effect of vasodilators, including nitric oxide, on the release of cGMP and cAMP in the isolated perfused rat kidney. European journal of pharmacology*, 1992. **220**(2-3): p. 161-171.
- [16] Durand, S., et al., *Exogenous nitric oxide inhibits sympathetically mediated vasoconstriction in human skin. The Journal of physiology*, 2005. **562**(2): p. 629-634.
- [17] Yosefzadeh, S., et al., *The effect of date palm pollen capsule on orgasm and sexual satisfaction in menopausal women: a double-blind controlled clinical trial. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 2017. **20**(10): p. 43-51.
- [18] Mirzaianajmabdi, K., *Effect of Vitex agnus-castus on sexual function in menopausal women. J Women's Health Care*, 2016. **5**(4).
- [19] Lucks, B.C., J. Sørensen, and L. Veal, *Vitex agnus-castus essential oil and menopausal balance: a self-care survey. Complementary Therapies in Nursing and Midwifery*, 2002. **8**(3): p. 148-154.
- [20] Dalil Heirati, S.F., et al., *Effect of Vitex agnus-castus plant on sexual function in women of reproductive age. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 2020. **23**(4): p. 62-74.
- [21] Abedy Ghehi, F., et al., *Germ cells Markers Expression in Mouse Premature Ovarian Failure Model. Pathobiology Research*, 2019. **22**(3): p. 149-157.
- [22] Emadi, A., R.J. Jones, and R.A. Brodsky, *Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nature reviews Clinical oncology*, 2009. **6**(11): p. 638-647.
- [23] Delkhosh, A., et al., *Upregulation of FSHR and PCNA by administration of coenzyme Q10 on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a mouse model. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2019. **33**(11): p. e22398.
- Jeelani, R., et al., *Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. Free Radical Biology and Medicine*, 2017. **110**: p. 11-18.
- Meng, Y., et al., *Sphingosine-1-phosphate suppresses cyclophosphamide induced follicle apoptosis in human fetal ovarian xenografts in*

همچنین از سرکار خانم فاطمه عابدی به پاس همراهی شان در این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- [1] Shelling, A.N., *Premature ovarian failure. Reproduction*, 2010. **140** (5): p. 633.
- [2] Qin, Y., et al., *NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. The American Journal of Human Genetics*, 2007. **81**(3): p. 576-581.
- [3] Krauss, C.M., et al., *Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. New England Journal of Medicine*, 1987. **317**(3): p. 125-131.
- [4] Altuntas, C.Z., J.M. Johnson, and V.K. Tuohy, *Autoimmune targeted disruption of the pituitary-ovarian axis causes premature ovarian failure. The Journal of Immunology*, 2006. **177**(3): p. 1988-1996.
- [5] Vegetti, W., et al., *Premature ovarian failure. Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000. **161**(1-2): p. 53-57.
- [6] Song, D., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. BioMed Research International*, 2016. **2016**.
- [7] Russo, M. and G.C. Galletti, *Medicinal properties and chemical composition of Vitex agnus-castus L.: a review. in International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants* 426. 1995.
- [8] Sørensen, J.M. and S.T. Katsiotis, *Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan Vitex agnus-castus fruits. Planta medica*, 2000. **66**(03): p. 245-250.
- [9] Wuttke, W., et al., *Chaste tree (Vitex agnus-castus)-pharmacology and clinical indications. Phytomedicine*, 2003. **10**(4): p. 348-357.
- [10] Gerhard, I., et al., *Gorkow. C., 1998. Mastodynnon (R) bei weiblicher Sterilitat. Randomisierte, plazebokontrollierte, klinische Doppel-blindstudie. Forsch Komplementarmed: p. 5,272-278.*
- [11] Abdnejad, R. and M. Simbar, *A review on herbal medicines effective of premenstrual syndrome in Iran. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 2016. **19**(11): p. 18-30.
- [12] Sadeghi, T., A. Azimi, and M. Loripoor, *Comparing the effect of black Cohosh versus Vitagnus on the improvement of menopause symptoms. The Iranian Journal of Obstetrics,*

- nude mice* ☆. Fertility and sterility, 2014. **102**(3): p. 871-877. e3.
- [24] Apperley, J. and N. Reddy, *Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy*. Blood reviews, 1995. **9**(2): p. 93-116.
- [25] Meier, B., et al., *Pharmacological activities of Vitex agnus-castus extracts in vitro*. Phytomedicine, 2000. **7**(5): p. 373-381.
- [26] Chen, X.-Y., et al., *Follicle loss and apoptosis in cyclophosphamide-treated mice: what's the matter?* International journal of molecular sciences, 2016. **17**(6): p. 836.
- [27] Luo, Q., et al., *Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in chemotherapy drug induced premature ovarian failure mice*. Life Sciences, 2017. **179**: p. 103-109.
- [28] 30) Bhartiya, D. and J. Singh, *FSH-FSHR3-stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer*. Reproduction, 2015. **149**(1): p. R35-R48.
- [29] Hardy, M.L., *Herbs of special interest to women*. Journal of the American Pharmaceutical Association (1996), 2000. **40**(2): p. 234-242.
- [30] Liu, J., et al., *Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of Vitex agnus-castus L.(chaste-berry)*. Phytomedicine, 2004. **11**(1): p. 18-23.
- [31] Jelodar, G. and E. Karami, *Effect of hydroalcoholic extract of vitex agnus-castus fruit on ovarian histology in rat with induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*. Journal of BABOL University of Medical Sciences, 2013. **15**(3): p. 96-102.
- [32] Zamani, M., N. Neghab, and S. Torabian, *Therapeutic effect of Vitex agnus castus in patients with premenstrual syndrome*. 2012.
- [33] AZARNIA, M., et al., *Effects of vitex agnus castus on mice fetus development*. 2007.
- [34] Feyzollahi, Z., et al., *Effect of Vitex agnus-castus ethanolic extract on hypothalamic KISS-1 gene expression in a rat model of polycystic ovary syndrome*. Avicenna journal of phytomedicine, 2021. **11**(3): p. 292.
- [35] Jelodar, G., S. Masoomi, and F. Rahmanifar, *Hydroalcoholic extract of flaxseed improves polycystic ovary syndrome in a rat model*. Iranian journal of basic medical sciences, 2018. **21**(6): p. 645.

Effect of Chaste tree fruit extract on ovarian tissue and sex hormones of POF model mice

Ghorbani K.¹, Siadat S. F.^{2,*}, Fathi R.³, Abedi F.³

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

² Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³ Department of Embryology, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Reproductive Biomedicine Research Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran.

* (Corresponding author): fsiadat2003@yahoo.com

Received: June.2023

Accepted: September.2023

Abstract

Background and purpose: Premature ovarian failure (POF) is known as a heterogeneous disorder that leads to amenorrhea and ovarian failure before the age of 40 and causes infertility in young women. Herbal Medicines are traditionally used to treat hormonal problems in women. This study was conducted to investigate the effect of Chaste tree fruit hydroalcoholic extract on ovarian function and body weight of mice after POF induction in mice.

Materials and methods: In this study, 50 mice were divided into five groups (n=10) including the vitex group, POF, and three experimental groups (creating POF model and gavage of vitex extract). After the effect of the extract, the ovarian tissue was studied with hematoxylin-eosin staining, and follicular count and serum level were checked.

Findings: The results showed that the number of follicles, corpus luteum, and body weight of mice in the POF group were significantly reduced. Also, the serum level of FSH hormones increased in the POF group and the E2 hormone decreased significantly compared to the control group ($p < 0.05$), which indicates the correct creation of POF models. After gavage of extract in POF mouse models, the serum level of hormones was adjusted and the number of ovarian follicles increased.

Conclusion: The results of the study showed that vitex extract in the highest tested dose has positive effects on the number of follicles, body weight, and sex hormones of mice in premature ovarian failure syndrome.

Keywords: premature ovarian failure, herbal medicines, ovary, cyclophosphamide.