

اثر ضد التهابی عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/ آلژینات در مدل موش صحرایی سندرم تخمدان پلی کیستیک

مجید حاجی حسینلو^۱، دکتر مریم پروینی کهنه شهری^۱، دکتر زهره قاضی طباطبایی^۲

۱) گروه زیست‌شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران، ۲) گروه شیمی کاربردی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران، نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول: ارومیه، کیلومتر دو جاده سلماس، دانشگاه آزاد ارومیه، مجتمع آیت الله رفسنجانی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دکتر مریم پروینی کهنه شهری؛ e-mail: parvini29@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان در سنین باروری است که با نازایی، اختلالات قاعدگی، افزایش آندروژن و کیست‌های تخمدانی همراه است. مطالعات نشان داده‌اند که سیتوکین‌های التهابی؛ از جمله $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در این بیماران افزایش می‌یابد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدالتهابی عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات بر بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در مدل حیوانی PCOS بود. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به صورت تصادفی به گروه‌های شاهد، PCOS و تجربی تقسیم شدند. استرادیول والرات به مقدار ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، با یکبار تزریق عضلانی، برای القاء PCOS استفاده شد. بعد از ۶۰ روز، گروه‌های تجربی با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات به صورت خوراکی و به مدت چهار هفته تیمار شدند. بیان نسبی ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در بافت تخمدان با استفاده از روش qRT-PCR بررسی شد. یافته‌ها: در گروه‌های تیمار شده با عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات کاهش تعداد فولیکول‌های کیستی و افزایش تعداد اجسام زرد مشاهده شد که نشان‌دهنده بهبود وضعیت تخمدانی می‌باشد. با دریافت ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم از عصاره گیاه ناخنک در هیدروژل کیتوسان/آلژینات، کاهش معنی‌داری در بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در گروه تیمار نسبت به گروه PCOS مشاهده گردید ($P < 0.01$ ، $P < 0.05$). نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که اثرات محافظتی عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات بر PCOS ممکن است به دلیل اثر ضد التهابی آن و تاثیر بر بیان ژن‌های التهابی باشد.

واژگان کلیدی: $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، ریخت‌شناسی تخمدان، عصاره گیاه ناخنک، هیدروژل کیتوسان/آلژینات، سندرم تخمدان

پلی کیستیک، مدل حیوانی

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۳/۲۵ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۴/۵/۹ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۵/۲۷

مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)^۱ یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان در سنین باروری است و حدود ۶ تا ۱۰ درصد از زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد.^۱ این سندرم یک بیماری چند عاملی محسوب می‌شود که در بروز آن عوامل ژنتیکی، متابولیکی، هورمونی و محیطی نقش

دارند.^{۲،۳} PCOS اغلب با علائمی مانند بی‌نظمی قاعدگی، افزایش آندروژن، مقاومت به انسولین، کیست‌های متعدد تخمدانی و در نهایت کاهش یا فقدان تخمک‌گذاری همراه است که می‌تواند منجر به ناباروری شود.^۴ اگرچه فقدان تخمک‌گذاری یکی از دلایل اصلی ناباروری در بیماران مبتلا به PCOS است، اما شکست لانه‌گزینی به دلیل اختلال در پذیرش آندومتر نیز از عوامل اساسی بروز اختلالات ناباروری در این بیماران محسوب می‌شود.^۵ فرآیند لانه‌گزینی

توسط عوامل متعددی از جمله سیتوکین‌های التهابی سیستم ایمنی تنظیم می‌شود. اختلال در سطح این سیتوکین‌ها می‌تواند باعث لانه‌گزینی ناموفق و در نهایت ناباروری شود.^۶ یکی از جنبه‌های مهم در بیماری‌زایی PCOS، وجود التهاب مزمن خفیف و فعالیت سیستم ایمنی؛ به‌ویژه در سطح بافت تخمدان است.^{۷،۸} سلول‌های ایمنی مانند لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها، و ماکروفاژها در خون محیطی مبتلایان به PCOS افزایش می‌یابد.^۹ علاوه بر این، نفوذ سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، در تخمدان‌های این بیماران مشاهده می‌شود. این سلول‌ها مقادیر زیادی از سیتوکین‌های پیش التهابی؛ مانند عامل نکروز تومور- α ($TNF-\alpha$)ⁱ و اینترلوکین ۶ ($IL-6$)ⁱⁱ را ترشح می‌کنند.^{۱۰} علاوه بر این، سطح بالایی از عوامل التهابی دیگر مانند پروتئین واکنشی C (CRP)، اینترلوکین-۱۸ ($IL-18$)، $IL-1\beta$ ، و پروتئین فراخوان مونوسیت ۱ ($MCP-1$)ⁱⁱⁱ در خون محیطی بیماران مبتلا به PCOS گزارش شده است که نشان‌دهنده وجود التهاب مزمن است.^{۸،۱۱} در نتیجه، پاسخ‌های التهابی به عنوان واسطه یا مدياتور عمل می‌کنند و به ظهور و تشدید ویژگی‌های متابولیک سندرم تخمدان پلی‌کیستیک کمک می‌کنند.^{۱۲،۱۳} $TNF-\alpha$ یک سیتوکین پیش‌التهابی کلیدی است که توسط سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها تولید می‌شود و در تشدید پاسخ‌های التهابی نقش دارد.^{۱۴،۱۵} $IL-6$ که از سلول‌های ایمنی و سلول‌های چربی تولید می‌شود، به‌عنوان یکی دیگر از عوامل التهابی نقش مهمی در فرآیندهای التهابی مرتبط با PCOS ایفا می‌کند.^{۱۶} اگرچه داروهای شیمیایی مختلفی برای درمان PCOS به کار می‌روند، اما عوارض جانبی و محدودیت‌های مصرف آن‌ها موجب شده تا توجه به درمان‌های جایگزین، به‌ویژه درمان‌های گیاهی، افزایش یابد. به عنوان مثال، مصرف متفورمین با عوارض جانبی شایع از جمله مشکلات گوارشی مانند حالت تهوع، استفراغ، درد معده و اسهال همراه است. این عوارض ممکن است در همه بیماران تحمل نشود و منجر به ترک درمان شود.^{۱۷،۱۸} اسپیرونولاکتون^{iv} می‌تواند باعث عدم تعادل الکترولیت‌ها مثل افزایش میزان یون پتاسیم یا هیپرکالمی^v، مشکلات کبدی و چرخه قاعدگی نامنظم شود.^{۱۷،۱۹} گیاه

ناخنک^{vi} از دیرباز در طب سنتی به‌دلیل خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ترمیم‌کننده‌اش در درمان بیماری‌های مختلف، از جمله زخم‌ها و اختلالات التهابی مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیبات فعالی چون فلاونوئیدها^{vii}، ترپن‌ها^{viii} و اسیدهای فنولیک^{ix} موجود در این گیاه، به‌ویژه کوئرستین^x و کائمپفرول^{xi}، نقش مهمی در مهار التهاب و محافظت سلولی ایفا می‌کنند مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این گیاه می‌تواند در کاهش شاخص‌های التهابی مانند $TNF-\alpha$ و $IL-6$ مؤثر باشد و در بیماری‌های التهابی مانند آرتریت، زخم‌های پوستی، بیماری‌های گوارشی و اختلالات متابولیک کاربرد داشته باشد.^{۲۰،۲۱} همچنین، برخی تحقیقات، اثربخشی ترکیبات گیاهی مشابه از جمله رزوراترول^{xii}، اسید گالیک^{xiii}، زعفران و گل سرخ را در کاهش علائم PCOS از طریق کاهش التهاب، بهبود حساسیت به انسولین و تنظیم سطح هورمون‌های جنسی گزارش کرده‌اند. بر این اساس، بررسی اثر عصاره گیاه ناخنک در مدل حیوانی PCOS، گامی در جهت گسترش درمان‌های طبیعی و کم‌عارضه برای این بیماری محسوب می‌شود.^{۲۲-۲۵} در سال‌های اخیر، استفاده از زیست‌بسپارهایی^{xiv} مانند کیتوسان^{xv} و آلژینات^{xvi} در سامانه‌های نوین دارورسانی به‌دلیل زیست‌سازگاری، قابلیت تشکیل هیدروژل، رهایش کنترل‌شده و کاهش سمیت مورد توجه زیادی قرار گرفته است.^{۲۶،۲۷} ترکیب این دوسپار یک ساختار هیدروژلی مناسب برای تثبیت و رهایش مؤثر ترکیبات گیاهی فراهم می‌کند.^{۲۸} با وجود شواهد فزاینده در خصوص نقش التهاب در بیماری‌زایی PCOS، تمرکز اغلب درمان‌های رایج بر جنبه‌های هورمونی یا متابولیک این بیماری بوده است و کمتر به مداخلات طبیعی با هدف تعدیل پاسخ‌های التهابی توجه شده است. همچنین، اطلاعات محدودی درباره استفاده از عصاره گیاه ناخنک به‌صورت تثبیت‌شده در سامانه‌های نوین دارورسانی برای کنترل التهاب در بافت تخمدانی بیماران مبتلا به PCOS در دسترس است. از این‌رو، این مطالعه با نوآوری در بهره‌گیری از

vi-Astragalus hamosus

vii-Flavonoids

viii-Terpenes

ix-Phenolic acids

x-Quercetin

xi-Kaempferol

xii-Resveratrol

xiii-Gallic Acid

xiv-Biopolymer

xv-Chitosan

xvi-Alginate

i-Tumor Necrosis Factor α

ii-Interleukin 6

iii-Monocyte Chemoattractant Protein-1

iv-Spironolactone

v-Hyperkalemia

واژینال از علائم وجود کیست‌های فولیکولی در تخمدان است. بررسی آسیب شناختی بافتی تخمدان‌ها برای تأیید PCOS انجام شد. سندرم تخمدان پلی کیستیک زمانی تشخیص داده شد که فولیکول‌های آترتیک و فولیکول‌های کیستیک در تخمدان‌ها شناسایی شدند.

تست اسمیر واژینال

قبل از القای سندرم تخمدان پلی کیستیک، باید از منظم بودن سیکل استروس حیوان اطمینان حاصل شود. برای این منظور از مطالعه میکروسکوپی اسمیر واژینال استفاده شد.^{۲۰} برای گرفتن اسمیر واژینال، ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی را توسط سر سمپلر به آرامی در واژن حیوان تزریق کرده و سپس یک تا دو قطره از مایع واژنی توسط سمپلر برداشته شد و بعد از قرار دادن روی لام از آن اسمیر تهیه شد. نمونه برداشت شده بلافاصله توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ بررسی گردید. چرخه استروس موش‌های صحرایی ماده ۴ روز طول می کشد و دارای مراحل پرواستروسⁱⁱⁱ، استروس^{iv}، مت استروس^v و دی استروس^{vi} می باشد. هر مرحله با نسبت خاص سلول‌های شاخی، اپی تلیالی با هسته، اپی تلیالی بدون هسته و لوکوسیت‌ها مشخص می گردد. موش‌هایی که دارای چهار مرحله فوق در چهار روز متوالی بودند موش‌های با چرخه منظم در نظر گرفته شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس چرخه تولید مثلی خود قرار داشتند برای ورود به مطالعه انتخاب شدند تا از نظم چرخه تولید مثلی اطمینان حاصل گردد. اسمیر واژن در این مرحله از چرخه دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی تلیال بوده و فاقد لوکوسیت می باشد.

تهیه عصاره گیاه ناخنک

گیاه ناخنک از عطاری معتبر در بازار سرپوشیده شهر تبریز تهیه و توسط کارشناس گیاه‌شناسی تأیید گردید. مقدار معینی از گیاه با استفاده از آسیاب برقی به پودر تبدیل شده و برای فرآیند عصاره‌گیری آماده شد. ۲۰۰ گرم از پودر تهیه شده در ظرف شیشه‌ای دردار حاوی ۶۰۰ میلی لیتر محلول اتانول ۹۶٪ و آب مقطر به نسبت ۱:۲، به مدت ۷۲ ساعت روی تکان دهنده قرار گرفت و به‌طور مداوم هم زده شد. به منظور جلوگیری از تأثیرات تابش نور بر ترکیبات فعال گیاه،

هیدروژل کیتوسان/آلژینات به عنوان حامل زیست تجدید پذیر عصاره ناخنک و بررسی اثرات آن بر شاخص‌های التهابی و ساختار بافت شناختی تخمدان، تلاشی برای پر کردن این خلأ پژوهشی به شمار می رود. با توجه به نقش قابل توجه التهاب در بیماری‌زایی PCOS و اهمیت یافتن روش‌های درمانی مؤثر و ایمن، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره گیاه ناخنک تثبیت شده در بستر هیدروژلی کیتوسان/آلژینات، بر بیان ژن‌های *TNF-α* و *IL-6* در مدل حیوانی سندرم تخمدان پلی کیستیک طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستارⁱ سالم با میانگین وزنی 180 ± 5 گرم و سن تقریبی ۷-۸ هفته از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری شدند. در کلیه مراحل کار، حیوانات تحت شرایط استاندارد دمایی کنترل شده (۲۵ درجه سانتی گراد) با چرخه نور روشنایی/ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. در این پژوهش غذای مخصوص موش با فرمولاسیون استاندارد تجاری به همراه آب آشامیدنی به صورت نامحدود در اختیار حیوانات قرار می گرفت. شرایط نگهداری برای تمامی حیوانات یکسان بود.

تأییدیه اخلاق

در کل مراحل اجرای کار، رعایت اصول اخلاقی طبق قوانین بین‌المللی و ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه با کد: IR.IAU.URMIA.REC.1400.003 صورت گرفت.

تیمار موش‌های صحرایی برای القاء PCOS

در این تحقیق از روش القاء هورمونی با استرادیول والراتⁱⁱ استفاده شد. بدین ترتیب که استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان - تهران) به میزان ۴ میلی گرم بر کیلوگرم به ناحیه کشاله ران در سطح شکمی به صورت یکبار داخل عضلانی به حیوانات با سن تقریبی ۷-۸ هفته و میانگین وزنی 180 ± 5 گرم تزریق گردید.^{۲۱} مدت زمان لازم جهت ایجاد مدل PCOS ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات بود. برای اطمینان از ایجاد تخمدان پلی کیستیک، اسمیر واژینال تهیه شد. وجود سلول‌های شاخی در اسمیر

iii-Proestrus
iv-Estrus
v-Metestrus
vi-Diestrus

i-Rattus Norvegicus
ii-Estradiol valerate

دستی) به پنج گروه پنج‌تایی تقسیم شدند تا توزیع یکنواخت حیوانات در گروه‌های آزمایشی تضمین شود:

(۱) گروه شاهد: موش‌های صحرایی سالم طبیعی بدون دریافت استرادیول والرات

(۲) گروه PCOS: در موش‌های صحرایی این گروه، القاء سندرم تخمدان پلی‌کیستیک با یکبار تزریق عضلانی استرادیول والرات (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) صورت گرفت.

(۳) گروه PCOS/A5: پس از القاء PCOS، موش‌های صحرایی این گروه عصاره گل ناخنک بر پایه هیدروژل کیتوسان/آلژینات را با مقدار ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از طریق گاواژ به مدت ۲۸ روز^{۲۱} دریافت نمودند.

(۴) گروه PCOS/A10: پس از القاء PCOS، موش‌های صحرایی این گروه عصاره گل ناخنک بر پایه هیدروژل کیتوسان/آلژینات را با مقدار ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از طریق گاواژ به مدت ۲۸ روز دریافت نمودند.

(۵) گروه PCOS/A15: پس از القاء PCOS، موش‌های صحرایی این گروه عصاره گل ناخنک بر پایه هیدروژل کیتوسان/آلژینات را با مقدار ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از طریق گاواژ به مدت ۲۸ روز دریافت نمودند.

ریخت‌شناسی بافت تخمدان

در پایان دوره درمان، حیوانات با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین هیدروکلراید (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند.^{۲۰} برای ارزیابی آسیب شناختی بافتی، تخمدان چپ از حفره شکمی موش‌ها خارج شد و بعد از جداسازی بافت‌های اضافی، با محلول سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد و سپس در محلول فیکساتور فرمالدئید ۱۰ درصد تثبیت شد. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی، مراحل آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در بلوک‌های پارافینی انجام شد. بعد از قالب‌گیری، بلوک‌ها به صورت سریالی و با ضخامت مقاطع ۷ میکرومتری برش داده شدند و با هماتوکسیلین-ئوزینⁱⁱⁱ (E&H) رنگ‌آمیزی شدند. ارزیابی روند تغییرات ریخت‌شناسی بافتی تخمدان از نظر تشکیل فولیکول‌های اولیه، ثانویه، گراف، فولیکول‌های کیستی و جسم زرد توسط بزرگ‌نمایی ۴۰ در زیر میکروسکوپ نوری صورت گرفت. تخمدان سمت راست نیز برای انجام تست مولکولی به فریزر

عملیات عصاره‌گیری در مکانی دور از نور مستقیم انجام گرفت. سپس، عصاره حاصل با استفاده از قیف بوختر صاف و محلول یکنواختی به دست آمد. عصاره نهایی با دستگاه روتاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.^{۲۱}

ساخت هیدروژل کیتوسان/آلژیناتⁱ حاوی عصاره گیاهی

برای تهیه هیدروژل‌ها از روش پیش‌ژل شدن یونوتروپیکⁱⁱ استفاده شد. ابتدا محلول آبی سدیم آلژینات تهیه گردید؛ برای این منظور ۰/۵ گرم سدیم آلژینات در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و سپس pH محلول با استفاده از اسید کلریدریک در حدود ۵/۲ تنظیم گردید. به محلول آبی سدیم آلژینات، ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید آبی با غلظت مشخص، بسته به غلظت محلول آلژینات، به‌صورت قطره‌ای اضافه شد. محلول با سرعت ۱۲۰۰ دور بر دقیقه روی همزن مغناطیسی هم زده شد و پس از نیم ساعت پیش‌ژل کلسیم آلژینات حاصل گردید. سپس ۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی کیتوسان که در محلول اسید استیک ۱٪ (وزنی/وزنی) تهیه شده بود، به پیش‌ژل کلسیم آلژینات افزوده شد و pH محلول در ۶/۵ تنظیم گردید و به مدت یک ساعت هم زده شد.^{۱۰} عصاره تهیه شده با نسبت‌های مشخص (۱۰/۵ و ۱۵ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر) به محلول اضافه گردید و هر محلول به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی هم زده شد.^{۲۱} محلول‌های تهیه شده به‌صورت قطره‌ای به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آبی حاوی یک گرم سدیم تری‌پلی‌فسفات و ۰/۸ گرم سود در حال همزدن، به‌طور جداگانه اضافه شدند و به منظور تکمیل فرآیند شبکه‌ای شدن، به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. هیدروژل‌های دانه‌ای به ترتیب با نام‌های (A5)، (A10) و (A15) شناخته شدند. این هیدروژل‌ها تا رسیدن به pH خنثی به‌طور کامل شستشو شده و سپس در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

تیمار حیوانات با عصاره حاوی هیدروژل کیتوزان/آلژینات

پس از تأیید نهایی مدل‌های PCOS با استفاده از روش‌های بافت‌شناسی و اسمیر واژینال، حیوانات با شماره‌گذاری اولیه و به صورت تصادفی (با روش قرعه‌کشی

iii-Hematoxylin and Eosin

i-Chitosan/Alginate
ii-Ionotropic gelation

منفی ۸۰ انتقال داده شد. سن تقریبی حیوانات در زمان نمونه گیری ۱۹-۲۰ هفته بود.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای این منظور از کیت استخراج RNA RNX-plusTM (ژن آل؛ کشور کره) طبق شیوه نامه سازنده استفاده شد. تمامی محلول ها و مواد پس از باز شدن کامل روی یخ قرار داده شد. نمونه های تخمدان با افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر RiboX به لوله حاوی نمونه روی یخ همگن شدند. لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس محلول با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف فاز رویی، ایزوپروپانول با همان حجم مایع رویی اضافه شد و کاملاً مخلوط شد. پلت نهایی در آب بدون نوکلئاز حل شد.

سپس، الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و نانودراپ به ترتیب برای تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراج شده استفاده شد. برای سنتز cDNA، از پرایمر هگزامر تصادفیⁱⁱ طبق دستورالعمل کیت رونویسی معکوس (رویان، بیوتک، تهران، ایران) استفاده شد.

انجام واکنش Real-Time PCR

برای بررسی میزان بیان ژن های مورد مطالعه از روش Real Time PCR استفاده گردید. برای انجام واکنش، از کیت مخصوص حاوی سایبرگرینⁱⁱⁱ و پرایمرهای اختصاصی ژن های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن های $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ و ژن اکتین (به عنوان ژن مرجع) بر اساس توالی استخراج شده از بانک ژن و با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای ژن های $IL-6$ ، $TNF-\alpha$ و ACTIN

شماره	ژن هدف	Seq. (۵'-...-۳')	دمای اتصال (°C)	Tm (°C)	طول جفت باند محصول	Accession number
۱	$IL-6$	(F): TATGAACAGCGATGATGCACT (R): ACAAACCTCCAGGTAGAAACGGAA	۵۸	۵۸/۴ ۵۷/۷	۸۰/۲bp	NM_012589.2
۲	$TNF-\alpha$	(F): ACTCTGACCCCTTTATCGTCT (R): CACTACTTCAGCGTCTCGT	۶۰	۵۸/۲ ۵۷/۳	۸۴/۳bp	NM_012675.3
۳	ACTIN	(F): CTCATGAAGATCCTGACCGAG (R): TCTCTTTAATGTCACGCACGA	۵۸/۷	۵۷/۶ ۵۷/۷	۷۹bp	NM_031144.3

تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف^v برای بررسی توزیع نرمال متغیرهای پیوسته استفاده شد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SEM) گزارش شدند. تجزیه و تحلیل داده های بیان ژن حاصل از Real-time PCR بر اساس روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. ابتدا مقدار Ct ژن هدف و ژن مرجع تعیین گردید. سپس ΔCt از اختلاف این دو به دست آمد. اختلاف ΔCt نمونه ها با گروه شاهد به عنوان $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد و بیان نسبی ژن هدف با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایش از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانکن^{vi} استفاده شد. نرم افزار گراف پد

اتصال صحیح پرایمرها به توالی های اختصاصی و نیز اتصال احتمالی پرایمرها به توالی های دیگر نیز توسط برنامه بلاست در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری مورد بررسی قرار گرفت. واکنش Real-time PCR در دستگاه ترموسایکلر کمپانی ABI انجام شد. برنامه دمایی لازم برای انجام واکنش Real-Time PCR، یک چرخه مرحله پیش واسرشت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه مرحله واسرشت به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه مرحله آنیلینگ^{iv} به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه مرحله طویل سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود.

i-GeneAll

ii-Random Hexamer

iii-SYBER green

iv-Annealing

v-Kolmogorov-Smirnov

vi-Duncan

پریزم ۷ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودارها استفاده شد. از نظر آماری، تفاوت در $p \leq 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل عصاره گیاه ناخنک به روش کروماتوگرافی

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه ناخنک، از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمیⁱⁱ (GC-MS) استفاده شد. کروماتوگرام GC-MS نشان داد که عصاره حاوی ترکیبات مختلفی با زمان‌های بازداری متفاوت است (شکل ۱- الف). کروماتوگرام عصاره حضور قله‌های متعدد در بازه زمانی ۱۰ تا ۵۰ دقیقه را نشان داد. قله‌های کوچکتر در زمان‌های بازداری کمتر (۲۰-۱۰ دقیقه) احتمالاً مربوط به ترکیبات سبک‌تر و فرارتر مانند ترکیبات معطر و مونوترپن‌ها هستند. در بازه‌های زمانی بالاتر، به‌ویژه در Rt حدود ۵۰-۴۵ دقیقه، قله‌های بزرگ و مشخص مشاهده شد که نشان‌دهنده حضور ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر مانند اسیدهای چرب بلند زنجیر و استرهای اسید چرب است. به‌طور خاص، دو قله تیز و برجسته در زمان‌های ۴۷/۷ دقیقه که به ترکیبات غیرقطبی و سنگین‌تر مانند β -سیتوسترولⁱⁱⁱ و استیگماسترول^{iv} و ۳۲/۳۷ دقیقه که مربوط به ترکیبات فنولی- فلاونوئیدی از جمله کائمفرول و کوئرستین مشاهده شد. این ترکیبات به‌ویژه به دلیل ویژگی‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و تعدیل‌کننده‌های هورمونی شناخته شده‌اند و ممکن است نقش کلیدی در اثرات درمانی عصاره ناخنک در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک داشته باشند.

تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز فوری^v (FTIR)

طیف FTIR نمونه‌های کیتوسان، آلزینات و هیدروژل (A10) در شکل ۱- ب نشان داده شده است. طیف FTIR مربوط به کیتوزان در حضور STPP شکل ۲a نشان‌دهنده قله‌هایی در محدوده $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ است که مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های OH- و پیوندهای درون مولکولی هیدروژنی می‌باشد. قله مشخص در 1634 cm^{-1} مربوط به گروه‌های CO-NH_2 است. ناحیه

$1000-1250\text{ cm}^{-1}$ به STPP اختصاص دارد و قله‌های 1076 cm^{-1} و 1411 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی گروه‌های NH_4^+ بوده که نشان‌دهنده برهم‌کنش بین گروه‌های فسفات STPP و گروه‌های آمینی کیتوزان است. طیف FTIR آلزینات در حضور STPP در شکل ۲b نیز قله مشخصی در 3436 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل نشان می‌دهد. قله ظاهر شده در 1146 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های اتری موجود در پلی‌ساکارید آلزینات است.

طیف FTIR مربوط به هیدروژل (A10) در شکل ۲c نشان‌دهنده قله‌های موجود در محدوده $3480-3200\text{ cm}^{-1}$ است که مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های OH- و پیوندهای هیدروژنی در ساختار شبکه هیدروژلی می‌باشد. قله‌های کوچک در محدوده $2700-2900\text{ cm}^{-1}$ به ارتعاش خمشی گروه‌های CH_2 - موجود در عصاره مربوط هستند. علاوه بر این، قله 1417 cm^{-1} به ارتعاش کششی متقارن گروه‌های کربوکسیلات نسبت داده شده و قله‌های موجود در $1134-1023\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه‌های اتری در عصاره می‌باشند.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، در طیف مربوط به هیدروژل کیتوسان/آلزینات/عصاره ناخنک (A10) نسبت به پایه‌های کیتوسان و آلزینات، قله‌های جدیدی ظاهر شده و بلندی قله‌ها نیز تغییر یافته است. این تغییرات، دلالت بر تشکیل ساختار شبکه‌ای هیدروژلی و برهم‌کنش‌های بین مولکولی بین گروه‌های فعال موجود در کیتوسان، آلزینات و عصاره دارد.

اسمیر واژینال

هر روز صبح به مدت چهار روز متوالی آزمایش اسمیر واژینال انجام شد. حیواناتی که ۳ یا ۴ چرخه استروس منظم و متوالی را نشان دادند، از نظر چرخه جنسی حیوانات طبیعی در نظر گرفته شدند و برای مطالعه انتخاب شدند. ظاهر سیتولوژیکی سلول‌های به‌دست آمده از آزمایش اسمیر واژینال موش برای تعیین چهار مرحله از چرخه استروس در شکل ۲ نشان داده شده است. اسمیر واژینال به‌دست آمده در طول مراحل پرواستروس و استروس شامل سلول‌های اپیتلیال چندوجهی و سلول‌های شاخی شده بود. در مرحله متاستروس، مخلوطی مساوی از لکوسیت‌ها، سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های شاخی شده مشاهده شد. همچنین، اسمیر واژینال به‌دست آمده در طول مرحله دی‌استروس شامل لکوسیت‌ها بود (شکل ۲).

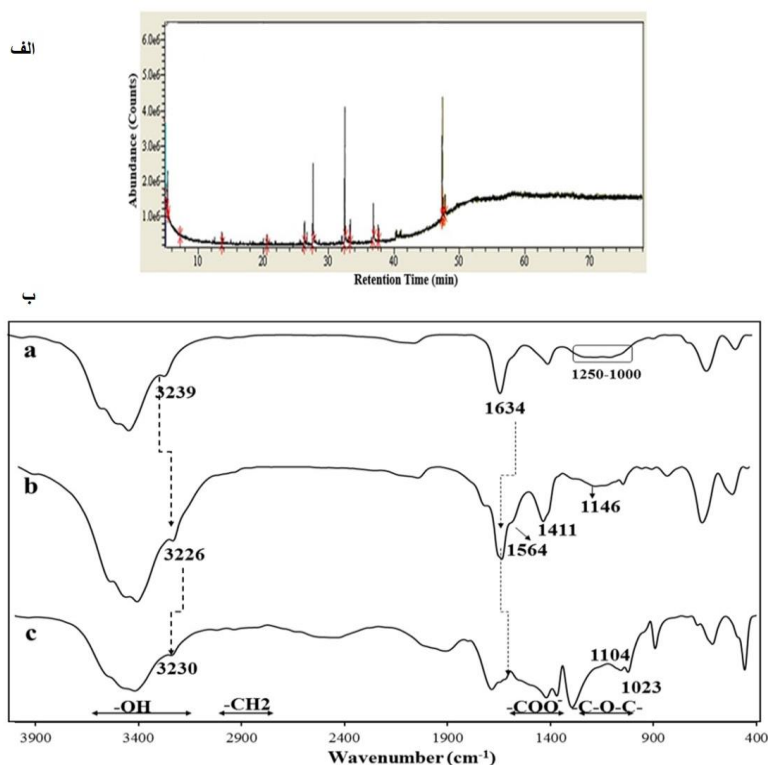
i-GraphPad Prism 7

ii-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

iii-Beta-Sitosterol

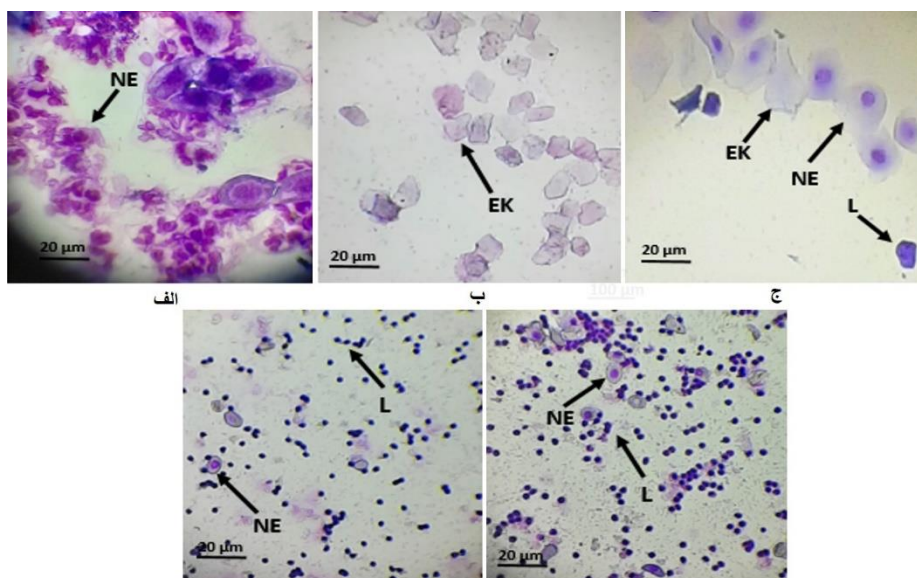
iv-Stigmasterol

v-Fourier Transform Infrared Spectroscopy



شکل ۱- آنالیز عصاره گیاه ناخنک:

(الف) منحنی کروماتوگرام، (ب) طیف FTIR (a) طیف کیتوسان، (b) طیف آلزینات و (c) طیف هیدروژل نمونه A10

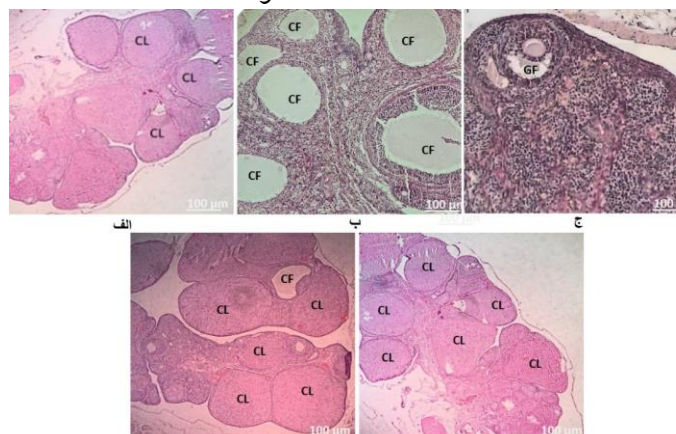


شکل ۲- اسمیر واژن برای بررسی چرخه استروس

موش‌های صحرایی سالم: (الف) مرحله پروستروس با سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار، (ب) مرحله استروس با کراتینوسیت‌های اپیتلیالی، (ج) مرحله متاستروس با کراتینوسیت‌های اپیتلیالی نامنظم، سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار و لوکوسیت‌ها، (د) مرحله دی اوستروس با تعداد زیادی لوکوسیت و تعداد کمی سلول‌های اپیتلیالی هسته‌دار، (ه) موش‌های صحرایی مدل PCOS با تعداد بسیار بالای لوکوسیت‌ها. NE: سلول‌های اپیتلیال هسته‌دار، EK: کراتینوسیت‌های اپیتلیال، L: لوکوسیت.

نتایج آسیب‌شناسی بافتی تخمدان

در گروه شاهد سالم، ساختار طبیعی مقطع یک تخمدان سالم، وجود فولیکول‌های طبیعی در مراحل مختلف تکوینی شامل فولیکول‌های اولیه، ثانویه و گراف و همچنین تعدادی جسم زرد را نشان داد. در گروه PCOS، تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با استرادیول والرات، فولیکول‌های بزرگ کیستیک با لایه گرانولوزای باریک در حد یک یا دو لایه سلولی که از مشخصه‌های PCOS است مشاهده شدند. در این گروه جسم زرد مشاهده نشد که دلیلی بر عدم تخمک‌گذاری طبیعی در این گروه بود. بنابراین تزریق استرادیول والرات پس از ۶۰ روز، منجر به ایجاد کیست و توقف رشد فولیکولی و عدم تخمک‌گذاری در این گروه شد که نشان‌دهنده القای موفق سندرم تخمدان پلی‌کیستیک با استفاده از استرادیول والرات است. در گروه‌های تیمار شده با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک بر پایه هیدروژل کیتوسان/آلژینات، تعداد کیست‌ها به تدریج کاهش یافت، به‌طوری‌که کیست‌ها ناپدید شدند و تخمدان‌ها مملو از اجسام زرد بودند که نشان‌دهنده شروع فرایند تخمک‌گذاری و طبیعی شدن ریخت‌شناسی تخمدان بود (شکل ۴). بدین‌ترتیب می‌توان به اثرات بهبود بخش عصاره گل ناخنک بر پایه هیدروژل کیتوسان/آلژینات بر بهبود ریخت‌شناسی تخمدان در حیوانات مبتلا به PCOS اشاره کرد.

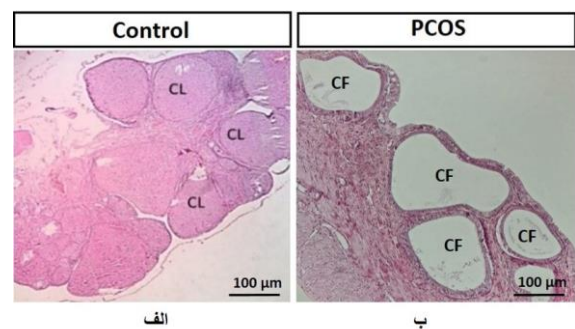


شکل ۴- فتومیکروگراف نوری از تخمدان سالم، مدل PCOS و بعد از تیمار با عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات.

(الف) فولیکول‌های طبیعی و همچنین تعدادی جسم زرد در گروه سالم. (ب) افزایش تعداد فولیکول‌های کیستی در تخمدان موش‌های صحرایی مدل PCOS القا شده با استرادیول والرات. (ج) تیمار با مقدار ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات. (د) تیمار با مقدار ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات. (ه) تیمار با مقدار ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات. کاهش تدریجی تعداد فولیکول‌های کیستی و افزایش تعداد جسم زرد پس از تیمار با سه مقدار مختلف از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/آلژینات در مقایسه با مدل PCOS. PF: فولیکول اولیه، SF: فولیکول ثانویه، GF: فولیکول گراف، CL: جسم زرد، CF: فولیکول کیستیک.

تأیید بافت شناختی در موش صحرایی مدل PCOS

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از مقاطع عرضی تخمدان موش‌های صحرایی سالم (شاهد) و موش‌های صحرایی تیمار شده با استرادیول والرات برای القای مدل PCOS، افزایش تعداد فولیکول‌های کیستیک و کاهش تعداد جسم زرد را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. افزایش تعداد فولیکول‌های پلی‌کیستیک، نشان‌دهنده القای موفقیت‌آمیز PCOS در بافت تخمدان می‌باشد (شکل ۳).



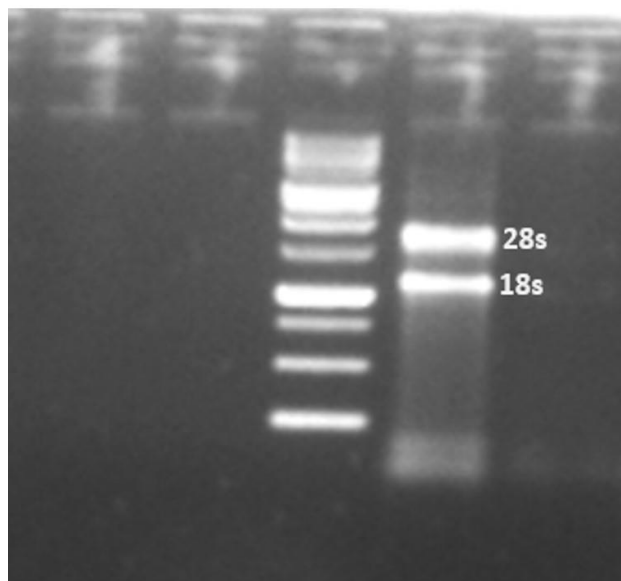
شکل ۳- تغییرات ریخت‌شناختی در بافت تخمدان گروه شاهد و PCOS

(الف) تخمدان سالم با جسم زرد مشخص، (ب) افزایش تعداد فولیکول‌های کیستیک بعد از تزریق استرادیول والرات در موش مدل PCOS. CL: جسم زرد، CF: فولیکول کیستیک

تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراج شده

RNA با کیفیت پایین می تواند منجر به نتایج نادرست و غیرقابل اعتماد در آزمایش های مولکولی شود. به همین دلیل، ارزیابی دقیق کیفیت و کمیت RNA قبل از استفاده از آن ضروری است. در لکتروفورز ژل آگارز، تشکیل باندهای واضح و تفکیک شده RNA ریبوزومی 18s و 28s نشان دهنده یکپارچگی خوب RNA و عدم تشکیل اسمیر است

(شکل ۵- الف). در تعیین کمیت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ، جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ خوانده شد. نسبت A260/A280 نشان دهنده خلوص RNA است. نسبت مطلوب برای RNA بین ۱/۸ تا ۲ است. نسبت پایین تر از ۱/۸ ممکن است نشان دهنده آلودگی با پروتئین یا سایر مواد باشد (شکل ۵- ب).



الف

Number	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
1	A2	0.812	0.412	0.04	0.718	0.346	2.075	574.746
2	A3	0.92	0.462	0.043	0.824	0.393	2.095	659.332
3	B2	0.362	0.199	0.041	0.296	0.146	2.034	236.892
4	B3	0.475	0.25	0.04	0.407	0.197	2.07	325.937
5	C2	0.572	0.301	0.04	0.496	0.244	2.036	397.047
6	C3	0.402	0.221	0.043	0.334	0.166	2.018	267.58
7	D2	1.007	0.503	0.049	0.899	0.426	2.112	719.561
8	D3	0.315	0.171	0.039	0.256	0.122	2.094	204.531
9	E2	0.307	0.17	0.04	0.246	0.12	2.05	196.597
10	E3	0.613	0.316	0.043	0.535	0.256	2.088	428.001
11	F2	0.449	0.235	0.038	0.381	0.182	2.091	304.816
12	F3	0.698	0.358	0.039	0.619	0.299	2.068	495.057
13	G2	0.599	0.304	0.039	0.522	0.247	2.114	417.516
14	G3	0.635	0.327	0.043	0.555	0.266	2.084	444.056
15	H2	1.113	0.55	0.042	0.999	0.473	2.111	799.174
16	H3	0.436	0.236	0.038	0.369	0.183	2.016	295.563
17	A2	0.159	0.107	0.046	0.099	0.054	1.851	79.519
18	A3	0.687	0.37	0.04	0.606	0.309	1.964	485.129
19	B2	0.513	0.267	0.041	0.438	0.21	2.089	350.434
20	B3	0.253	0.159	0.039	0.197	0.111	1.783	157.793
21	C2	0.56	0.304	0.044	0.482	0.243	1.986	385.387
22	C3	0.824	0.417	0.042	0.737	0.354	2.083	589.758
23	D2	0.614	0.328	0.04	0.537	0.27	1.991	429.616
24	D3	0.361	0.197	0.041	0.298	0.145	2.061	238.568
25	E2	0.855	0.429	0.04	0.763	0.364	2.097	610.284

ب

شکل ۵- بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده:

(الف) الکتروفورز RNA و مشاهده باندهای تفکیک شده 18s و 28s روی ژل، (ب) تعیین خلوص RNA با نانودراپ.

بیان ژنهای *TNF-α* و *IL-6* در تخمدان

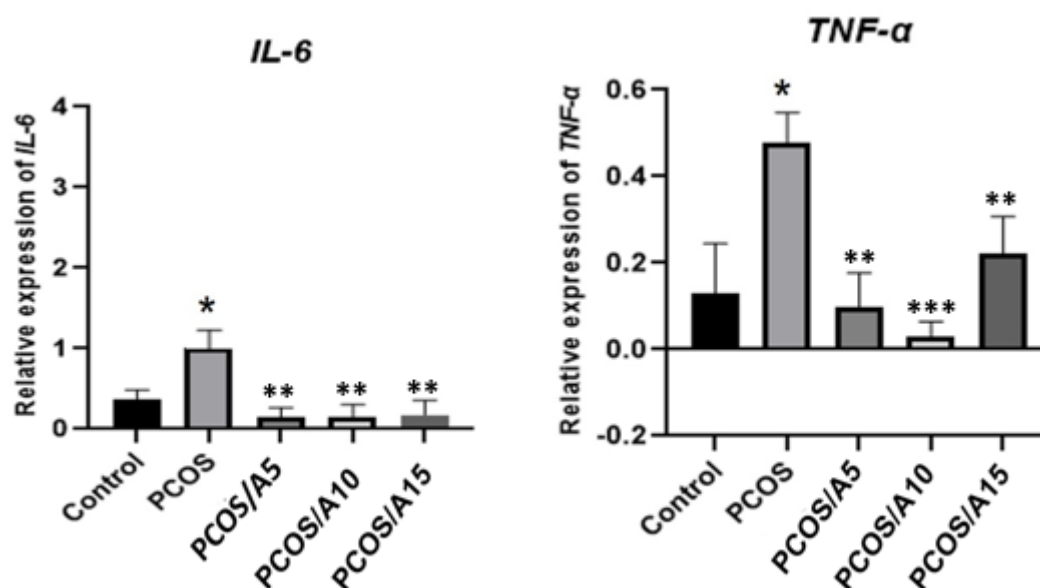
میزان بیان ژن *TNF-α* در نمونه موش های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک نسبت به نمونه سالم شاهد افزایش معنی داری داشته است. که به دلیل افزایش بیان ژن *TNF-α* در این بیماری می باشد. دریافت مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/ آلژینات، بیان ژن *TNF-α* کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه PCOS نشان داد ($P < 0.05$).

($P < 0.01$)

میزان بیان ژن *IL-6* در نمونه موش های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک نسبت به نمونه سالم شاهد افزایش معناداری داشته است. دریافت مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/ آلژینات، بیان ژن *IL-6* کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه PCOS نشان داد ($P < 0.05$).

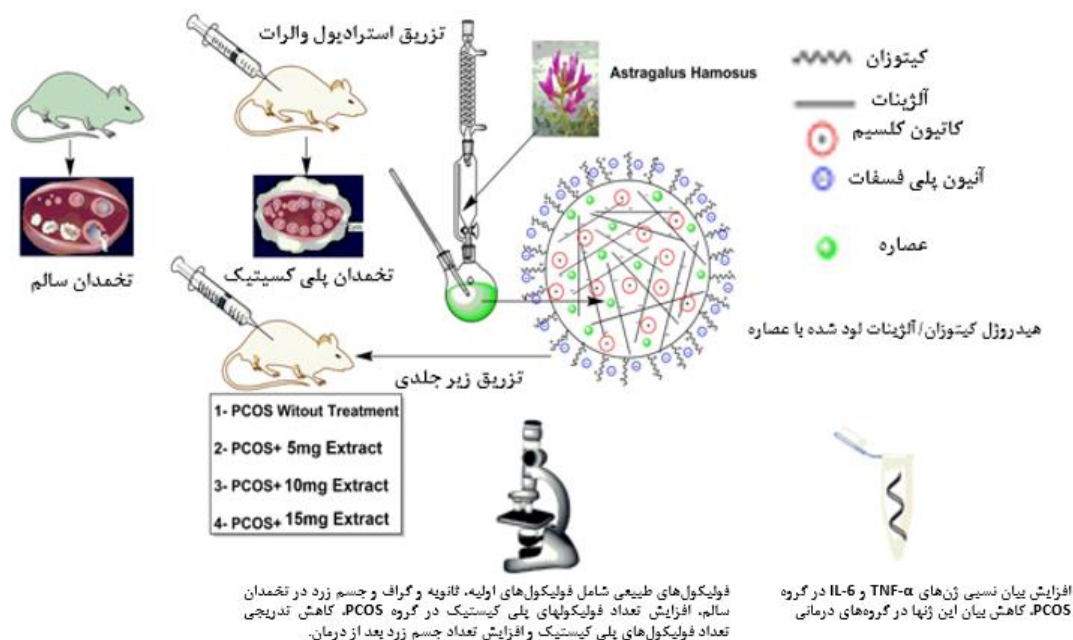
($P < 0.01$) (شکل ۶).

روند کلی این مطالعه شامل روش کار و نتایج به صورت نمایشی در شکل ۷ نشان داده شده است (شکل ۷).



شکل ۶- بیان نسبی ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$

افزایش معنی‌دار بیان این ژن‌ها در تخمدان موش‌های صحرایی مدل PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم. کاهش معنی‌دار بیان این ژن‌ها پس از تیمار با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره گل ناخنک تثبیت شده در هیدروژل کیتوسان/ آلژینات در مقایسه با موش‌های صحرایی مدل PCOS ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$) داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار، تعداد حیوان در هر گروه ۵ سر.



شکل ۷- تصویر شماتیک از خلاصه روند کار در این مطالعه. سندرم تخمدان پلی‌کیستیک با تزریق عضلانی استرادیول والرات در موش صحرایی ایجاد شد و با ارزیابی آسیب شناختی بافتی تایید شد. موش‌های PCOS با سه مقدار مختلف از عصاره شامل ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره تثبیت شده گیاه ناخنک روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات تیمار شدند. بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ و $IL-6$ توسط Real time-PCR در زمان واقعی ارزیابی شد. آسیب‌شناسی بافتی تخمدان‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بحث

در مطالعه حاضر، بهبود ریخت شناسی تخمدان و همچنین کاهش بیان ژنهای پیش التهابی $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در بافت تخمدان موشهای صحرایی مدل PCOS بعد از تیمار با از عصاره تثبیت شده گیاه ناخنک روی هیپروژل کیتوزان/آلژینات مشاهده شد.

PCOS یک اختلال غدد درون ریز است که زنان در سنین باروری را تحت تاثیر قرار می دهد و علت اصلی ناباروری بدون تخمگذاری است.^{۲۱} یکی از ویژگی های مهم سندرم تخمدان پلی کیستیک، شرایط التهابی مزمن خفیف است که به عنوان عامل تاثیر گذار در بیماریزایی این سندرم شناخته شده است. التهاب می تواند تولید طبیعی فولیکول ها را در تخمدان تغییر دهد و منجر به عدم تخمگذاری و ناباروری شود.^{۲۲} در تحقیق حاضر، از استرادیول والرات برای ایجاد مدل PCOS در موشهای صحرایی استفاده شد. در این مطالعه، تغییرات بافت تخمدان در موشهای صحرایی مبتلا به PCOS با نتایج مطالعات فرهادی آذر و همکاران و مظلوم و همکاران مطابقت داشت که نشان دهنده القای موفقیت آمیز و ایجاد نقص در روند تکوین دسته های فولیکولی، افزایش تعداد فولیکول های کیستی و کاهش تعداد اجسام زرد در مقایسه با گروه شاهد بود.^{۲۳، ۲۴}

مطالعات متعدد، اثرات مثبت استفاده از عصاره های گیاهی مختلف یا ترکیبات فعال آن ها را مانند گل ابری^{۲۵}، گل سرخ^{۲۶}، روزراترول^{۲۷}، قارچ چاگا^{۲۸} در بهبود ویژگی های آسیب شناختی بافت تخمدان پلی کیستیک؛ شامل کاهش تعداد فولیکول های کیستیک و افزایش تعداد اجسام زرد نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تیمار با از عصاره تثبیت شده گیاه ناخنک موجب کاهش تعداد فولیکول های کیستیک و افزایش تعداد اجسام زرد می شود که نشان دهنده اثربخشی گیاه ناخنک در بهبود علائم آسیب شناسی بافتی PCOS است. این نتایج همسو با نتایج مطالعات ذکر شده می باشند.

گیاه ناخنک حاوی ترکیبات زیست فعال مختلفی از جمله فلاونوئیدها، ساپونین ها، ترپن ها، آلکالوئیدها، تانن ها، فله ها و پلی ساکاریدها هستند که در ایجاد خواص ضد التهابی،

آنتی اکسیدانی و تعدیل کننده سیستم ایمنی آن نقش دارند.^{۲۹، ۳۰} ترکیبات فرار این گیاه فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی را در برابر لوسمی لنفوئیدی حاد انسان نشان داده است.^{۳۱} کراسستوا و همکاران اثرات ضد تکثیر فلوونوئیدها و ساپونین های این گیاه را در تکثیر سلول های بدخیم گزارش کردند.^{۳۲} مطالعات حاکی از آن است که ترکیبات فلوونوئیدی در گیاهان با فعالیت آنتی اکسیدانی می توانند موجب کاهش استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان و کاهش تعداد فولیکول های کیستیک در این بافت شوند.^{۳۳} با استناد بر این یافته ها، کاهش تعداد فولیکول های کیستیک با گیاه ناخنک می تواند به دلیل وجود ترکیبات فلوونوئیدی در این گیاه باشد.

اگرچه بیماریزایی PCOS مبهم به نظر می رسد، اما مشخص شده است که التهاب مزمن خفیف یکی از علائم و علل اصلی آن است.^{۳۴} التهاب موضعی تخمدان بر تخمگذاری تاثیر می گذارد و التهاب سیستمیک را القا یا تشدید می کند.^{۳۵} در سال های اخیر اثبات وجود درجات خفیف التهاب و استرس اکسیداتیو در بیماران نابارور مبتلا به PCOS، توجه محققین را به سوی بررسی دقیق تر نقش التهاب در ایجاد و یا پیشرفت PCOS، به عنوان یک بیماری التهابی معطوف داشته است. در بیماران مبتلا به PCOS، سطح عوامل پیش التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و CRP ^{۳۶} در مقایسه با افراد سالم افزایش می یابند. این سیتوکین ها فرایندهای تولید مثلی، از جمله فولیکولزایی، تخمگذاری و لقاح را کنترل می کنند.^{۳۷} افزایش سطح $TNF-\alpha$ ممکن است باعث افزایش تعداد فولیکول های کیستی در هر تخمدان، هایپرپلازی فولیکولی، کاهش میزان تخمگذاری و کاهش تولید پروژسترون در بیماران مبتلا به PCOS شود.^{۳۸} در مطالعه ما نیز افزایش تعداد فولیکول های کیستی همراه با افزایش میزان بیان $TNF-\alpha$ در موشهای صحرایی مدل PCOS مشاهده شد.

$IL-6$ یکی از عوامل اصلی تنظیم کننده یک وضعیت التهابی مزمن است.^{۳۹} فعالیت $IL-6$ توسط مولکول های مختلف پیش التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، اینترفرون- γ ($IFN-\gamma$) و $IL-1$ تحریک می شود. CRP یک پروتئین فاز حاد مشتق از کبد است که در پاسخ به آزادسازی $IL-6$ از سلول های ایمنی فعال شده مانند ماکروفاژها و نیز سلول های چربی تولید

- i-Ageratum Conyzoides
- ii-Rosa damascene
- iii-Resveratrol
- iv-Inonotus obliquus

می‌شود. این فرآیند بخشی از پاسخ التهابی گسترده‌تر بدن است، که در آن CRP به عنوان یک نشانگر زیستی کلیدی عمل می‌کند.^{۴۲} کلی و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای اولین بار سطح بالای CRP را به عنوان یک نشانگر شناخته شده از فعالیت التهابی در بیماران مبتلا به PCOS گزارش کردند.^{۴۴} *IL-6* و *TNF-α* به عنوان عواملی شناخته می‌شوند که در تحریک تولید CRP در کبد نقش دارند. بنابراین، سطح بالای CRP می‌تواند به عنوان یک نشانگر غیرمستقیم برای سطوح بالاتر *IL-6* و *TNF-α* استفاده شود.^{۴۵} در سال ۲۰۱۷، محمدی و همکارانش گزارش دادند که اثرات ضد التهابی کورکومین بر مدل موش صحرایی PCOS ممکن است به دلیل اثر مهارى آن بر نشانگرهای سطح *TNF-α*، *IL-6* و *CRP* باشد.^{۴۶} صفاییان و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که درمان با سیتاگلیپتینⁱ بیان ژن‌های *TNF-α*، *TGF-β*، *IL-6* و *IL-1β* و سطح سرمی CRP را در تخمدان‌های موش صحرایی مبتلا به PCOS کاهش می‌دهد.^{۴۷}

مطالعات متعدد خواص ضد التهابی فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، تانن‌ها و سایر ترکیبات پلی‌فنلی را نشان داده‌اند.^{۴۸} نتایج یک مطالعه نشان داد که از بین ترکیبات شناسایی شده در علف چایⁱⁱ، فلاونوئیدها قوی‌ترین اثرات ضد التهابی را دارند.^{۴۹} مطالعه‌ای دیگر، اثر ضد التهابی مونوساکارید GLPⁱⁱⁱ در قارچ گانودرما را نشان داد.^{۴۸} Okay و همکاران نشان دادند که استفاده از قارچ گانودرما و علف چای باعث کاهش سطح عوامل التهابی *TNF-α* و *IL-6* در موش‌های صحرایی مدل PCOS شد.^{۴۹} این خاصیت ضد التهابی می‌تواند مربوط به فلاونوئیدها در علف چای و مونوساکارید GLP در قارچ گانودرما باشد. واعذ و همکاران نیز در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که مصرف فلاونوئید کوئرستین در زنان مبتلا به PCOS، سطح نشانگرهای التهابی *IL-6* و *TNF-α* را کاهش داد.^{۵۰} همسو با این مطالعات، تیمار موش‌های صحرایی مدل PCOS با عصاره گل ناخنک تثبیت شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات موجب کاهش میزان بیان ژن‌های *TNF-α* و *IL-6* در بافت تخمدان شد. با توجه به نتایج مطالعات قبلی، فلاونوئیدها و پلی ساکارید موجود در بین ترکیبات زیست فعال گیاه ناخنک می‌تواند یکی از دلایل احتمالی اثر ضد التهابی این گیاه باشد.

علاوه بر این، تری‌ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و تانن‌ها به عنوان مهارکننده سنتز پروستاگلاندین شناخته می‌شوند و اثر گیاه ناخنک در بهبود فاز مزمن التهاب را می‌توان به مهار آزادسازی پروستاگلاندین به دلیل وجود این اجزا نیز نسبت داد.^{۴۱} این اثرات ممکن است به کاهش التهاب سیستمیک و استرس اکسیداتیو مرتبط با PCOS کمک کند و به طور بالقوه سطح بالای سیتوکین‌هایی مانند *TNF-α* و *IL-6* را کاهش دهد.

وکیلی و همکاران در سال ۲۰۲۵ نشان دادند فرآورده طبیعی با خاصیت ضدالتهابی مانند رزمارینیک اسید میزان بیان عوامل التهابی از جمله *TNF-α* و *IL-6* را در تخمدان PCOS به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد.^{۵۱}

در مطالعات دیگر نیز استفاده از فرآورده‌های طبیعی و عصاره‌های گیاهی مختلف از جمله اسید گالیک^{iv}،^{۵۲} زعفران^{۵۳} و قارچ چاگا^{۵۴} باعث کاهش سطح بیان ژن‌های التهابی *TNF-α* و *IL-6* شد. همسو با این مطالعات، در مطالعه حاضر، تیمار با عصاره گل ناخنک تثبیت شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات، باعث کاهش میزان بیان ژن‌های التهابی *TNF-α* و *IL-6* در مقایسه با مدل PCOS گردید.

IL-6 و *TNF-α* از جمله عوامل التهابی هستند که با شاخص توده بدنی و مقاومت انسولینی ارتباط دارند.^{۵۵} مقاومت به انسولین یکی از ویژگی‌های رایج PCOS است که تقریباً ۵۰ تا ۷۰ درصد از زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به طور خاص با عوارض تولیدمثلی و متابولیکی این سندرم همراه است.^{۵۳،۵۴} ارتباط بین مقاومت به انسولین و التهاب مزمن یک چرخه معیوب ایجاد می‌کند که اختلالات متابولیک و تولید مثلی مشاهده شده در زنان مبتلا به PCOS را تشدید می‌کند.^{۵۵} نتایج یک مطالعه نشان داد که کوئرستین با بهبود مقاومت به انسولین و التهاب، اثر درمانی مطلوبی بر روی موش‌های مدل PCOS دارد.^{۵۶} *TNF-α* با کاهش سطح پروتئین‌های سوبسترای گیرنده انسولین ۱ (*IRS-1*) و ناقل گلوکز ۴ (GLUT4) توانایی کاهش بیان انسولین را دارد.^{۵۷} در مطالعه‌ای که توسط نجاتی و همکاران صورت گرفت، تیمار موش‌های صحرایی مدل PCOS با عصاره گل ناخنک تثبیت‌شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات تولید انسولین را با افزایش میزان بیان ژن *IRS-1* افزایش داد.^{۴۹} با توجه به نقش محوری مقاومت به انسولین در بیماریزایی PCOS، به نظر

i-Sitagliptin

ii-Hypericum Perforatum

iii-Ganoderma Lucidum Polysaccharide

iv-Gallic Acid

v-Safron

باشد. پیشنهاد می شود در مطالعات آینده، برداشت نمونه ها در یک فاز مشخص از چرخه استروس (نظیر دی استروس) انجام گیرد.

نتیجه گیری

داده های به دست آمده در این مقاله نشان می دهد که تیمار با عصاره گل ناخنک تثبیت شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات، سطح عوامل پیش التهابی *TNF-α* و *IL-6* را در تخمدان مدل موش صحرایی PCOS بهبود بخشیده است. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که عصاره گل ناخنک تثبیت شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات ممکن است قابلیت استفاده در درمان و مدیریت التهاب مزمن در PCOS را داشته باشد. با این حال، PCOS یک بیماری چند عاملی است و مطالعات بیشتری برای تأیید نقش عصاره گل ناخنک تثبیت شده روی هیدروژل کیتوزان/آلژینات در بهبود و مدیریت علائم این بیماری مورد نیاز است. مطالعات بالینی جامع روی این گیاه می تواند منجر به کاربردهایی در انسان شود.

سپاس گزاری: از آقای دکتر فرهاد فرهنگ پژوه، رئیس آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ارومیه به خاطر همکاری در جراحی حیوانات و استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از تمامی مسئولین آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد ارومیه بابت همکاری در استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی کمال تشکر و قدردانی را داریم. نتایج گزارش شده در این مطالعه مربوط به پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشجو، آقای مجید حاجی حسینیلو است و حامی مالی ندارد.

تعارض منافع: هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان در رابطه با این مطالعه، اسامی نویسندگان و انتشار مقاله وجود ندارد.

می رسد که بهبود حساسیت به انسولین توسط عوامل حساس کننده به انسولین ممکن است در کاهش التهاب و درمان بیماران مبتلا به PCOS مؤثر باشد.

نقاط قوت و ضعف مطالعه

از نقاط قوت این مطالعه می توان به استفاده از مدل حیوانی استاندارد سندرم تخمدان پلی کیستیک، کاربرد سامانه دارورسانی کیتوسان/آلژینات با قابلیت رهایش کنترل شده، و ارزیابی دقیق شاخصهای التهابی *TNF-α* و *IL-6* در تخمدان به عنوان شاخص های وجود التهاب مزمن در تخمدان پلی کیستیک اشاره کرد. وجود این التهاب مزمن با مشاهده لوکوسیت های فراوان در تست اسمیر واژینال موش مدل PCOS تقویت شد. با این حال، مطالعه حاضر محدودیت هایی نیز دارد. نخست، این تحقیق در سطح حیوانی انجام شده و انجام مطالعات بالینی در انسان می تواند اعتبار بیشتری به نتایج ببخشد. دوم، مسیرهای اکسیداتیو و مکانیسم های دقیق دخیل در بیماریزایی و پاسخ به تیمار، به طور جزئی بررسی نشده اند. علاوه بر این، ما مواد فعال بیولوژیکی را استخراج نکرده و اثرات آنها را به طور جداگانه تجزیه و تحلیل نکردیم. استفاده از روش های دقیق تر برای جداسازی مؤلفه های مؤثر می تواند در بهینه سازی اثرات درمانی در مطالعات آینده مؤثر واقع شود. پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی عوامل ضد التهابی نیز بررسی شوند تا کارایی این گیاه در بهبود التهاب در PCOS از طریق افزایش عوامل ضد التهابی همزمان با کاهش عوامل پیش التهابی بهتر تأیید شود. محدودیت دیگر این مطالعه آن است که فاز استروس حیوانات در زمان برداشت تخمدان ها مشخص نگردید. با توجه به تأثیر فاز چرخه استروس بر وضعیت بافتی و هورمونی، ثبت این فاز می توانست در کاهش تنوع بیولوژیکی و افزایش دقت تحلیل ها نقش داشته

References

1. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2745–9.
2. Dilliyappan S, Kumar AS, Venkatesalu S, Palaniyandi T, Baskar G, Sivaji A, et al. Polycystic ovary syndrome: Recent research and therapeutic advancements. *Life Sci* 2024; 359: 123221.
3. Bostani RJ, Kohneshahri MP. Polycystic Ovarian Syndrome: Clinical Features, Genetics of Disease, and Diagnosis Criteria. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2021; 29: 3785-3810
4. Ghafari A, Maftoohi M, Samarin ME, Barani S, Bani-mohammad M, Samie R. The last update on polycystic ovary syndrome (PCOS), diagnosis criteria, and novel treatment. *Endocrine and Metabolic Science* 2025: 100228.
5. Matsuyama S, Whiteside S, Li S-Y. Implantation and decidualization in PCOS: unraveling the complexities of pregnancy. *Int J Mol Sci* 2024; 25: 1203.
6. Kicińska AM, Maksym RB, Zabielska-Kaczorowska MA, Stachowska A, Babińska A. Immunological and metabolic causes of infertility in polycystic ovary syndrome. *Biomedicines* 2023; 11: 1567
7. Zhai Y, Pang Y. Systemic and ovarian inflammation in women with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Immunol* 2022; 151: 103628.

8. Xiong Y-l, Liang X-y, Yang X, Li Y, Wei L-n. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 159: 148–50.
9. He S, Mao X, Lei H, Dong B, Guo D, Zheng B, et al. Peripheral blood inflammatory-immune cells as a predictor of infertility in women with polycystic ovary syndrome. *J Inflamm Res* 2020; 13: 441-50.
10. Liu S, Hong L, Mo M, Xiao S, Chen C, Li Y, et al. Evaluation of endometrial immune status of polycystic ovary syndrome. *J Reprod Immunol* 2021; 144: 103282.
11. Orisaka M, Mizutani T, Miyazaki Y, Shirafuji A, Tamamura C, Fujita M, et al. Chronic low-grade inflammation and ovarian dysfunction in women with polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and aging. *Front Endocrinol* 2023; 14: 1324429.
12. Bansal B, Kishore AT, Kathiresan S, Ghachi AF, Pradhan S, Paul S, et al. A Systematic Review of Inflammatory Markers in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Meta-Analysis of Interleukin-6 (IL- 6) in Case-Control Studies. *Cureus* 2025; 17: e82350.
13. Dey R, Bhattacharya K, Basak AK, Paul N, Bandyopadhyay R, Chaudhuri GR, et al. Inflammatory perspectives of polycystic ovary syndrome: role of specific mediators and markers. *Middle East Fertility Society Journal* 2023; 28: 33.
14. Gao L, Gu Y, Yin X. High serum tumor necrosis factor-alpha levels in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *PloS One* 2016; 11: e0164021.
15. Thathapudi S, Kodati V, Erukkambattu J, Katragadda A, Addepally U, Hasan Q. Tumor necrosis factor-alpha and polycystic ovarian syndrome: a clinical, biochemical, and molecular genetic study. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; 18: 605–9.
16. Peng Z, Sun Y, Lv X, Zhang H, Liu C, Dai S. Interleukin-6 levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 2016; 11: e0148531.
17. Rashid R, Mir SA, Kareem O, Ali T, Ara R, Malik A, et al. Polycystic ovarian syndrome-current pharmacotherapy and clinical implications. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2022; 61: 40–50.
18. Morley LC, Tang T, Yasmin E, Norman RJ, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database of Syst Rev* 2017; 11: CD003053.
19. Vaclavik J, Jelinek L, Jarkovsky J, Benesova K, Tava-cova D, Kamasova M, et al. Adverse effects of spironolactone in long-term treatment of resistant arterial hypertension. *European Heart Journal* 2019; 40: ehz748.0065.
20. Mesbahzadeh B, Hassanzadeh-Taheri M, Vazifeshenas-Darmiyan K, Moodi N, Hosseini M. Effect of Co-administration of Astragalus hamosus L. ethanolic Extract and Metformin on Reproductive Parameters in Diabetic Male Rats. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2022, 31: 14-29.
21. Shojaii A, Motaghinejad M, Norouzi S, Motevalian M. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of the extract and fractions of Astragalus hamosus in animal models. *Iran J Pharm Res* 2015; 14: 263-9.
22. Mazloom BF, Edalatmanesh MA, Hosseini SE. Gallic acid reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative damage in a rat model of estradiol-induced polycystic ovary. *Comparative Clinical Pathology* 2019; 28: 1281–6.
23. Farhadi-Azar M, Ghahremani M, Mahboobifard F, Noroozzadeh M, Yaghmaei P, Tehrani FR. Effects of Rosa damascena on reproductive improvement, metabolic parameters, liver function and insulin- like growth factor-1 gene expression in estradiol valerate induced polycystic ovarian syndrome in Wistar rats. *Biomed J* 2023; 46: 100538.
24. Furat Rencber S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, Sezer Z, Kum T, Ceylan S, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *J Ovarian Res* 2018; 11: 1–16.
25. Moshfegh F, Balanejad SZ, Shahrokhbabady K, Attaranzadeh A. Investigating the Effect of Crocus sativus (Saffron) Petal Hydro-alcoholic Extract on Ovarian Follicle, Inflammatory Markers, and Antioxidant Enzymes in Mice Model of Polycystic Ovary Syndrome. *J Reprod Infertil* 2022; 23: 18.
26. Jafari H, Ghaffari-Bohloul P, Podstawczyk D, Nie L, Shavandi A. Tannic acid post-treatment of enzymatically crosslinked chitosan-alginate hydrogels for biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2022; 295: 119844.
27. Do NH, Truong QT, Le PK, Ha AC. Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 2022; 294: 119726.
28. Cerdá-Bernad D, Pitterou I, Tzani A, Detsi A, Frutos MJ. Novel chitosan/alginate hydrogels as carriers of phenolic-enriched extracts from saffron floral by-products using natural deep eutectic solvents as green extraction media. *Curr Res Food Sci* 2023; 6: 100469.
29. Ramadoss M, Vijayaraman M, Jessica A. Estradiol valerate dose determination for PCOS induction. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2019; 2: 2321-3272.
30. Safaeian A, Izadi M, Mehrjerdi FZ, Yadegari M, Rezvani ME. The effect of sitagliptin on inflammatory mediators in the ovary of rat with polycystic ovary syndrome. *International Journal of Medical Laboratory* 2022; 9: 55-64.
31. Nejati A, Shahri MP, Farahvash T. Astragalus hamosus Acts as an Insulin Sensitizer in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome Rat Models by Affecting IRS1 Expression. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2022; 22: 348–56.
32. Adelakun SA, Ukwenya VO, Peter AB, Siyanbade AJ, Akinwumiju CO. Therapeutic effects of aqueous extract of bioactive active component of Ageratum conyzoides on the ovarian-uterine and hypophysis-gonadal axis in rat with polycystic ovary syndrome: Histomorphometric evaluation and biochemical assessment. *Metabol Open* 2022; 15: 100201.
33. Zhang J, Saeed A, Hussain M, Siddique R, Xu H, Bazmi RR, et al. Aqueous Ethanolic Extract of Inonotus obliquus Ameliorates Polycystic Ovarian Syndrome by Modulating Oxidative Stress and Downregulating TNF- α and Interleukin-6. *Journal of Food Biochemistry* 2024; 2024: 1003797.34.
34. Krasteva I, Platikanov S, Nikolov S, Kaloga M. Flavonoids from Astragalus hamosus. *Nat Prod Res* 2007; 21: 392-5.
35. Momekov G, Krasteva I, Platikanov S, Nikolov S, Konstantinov S. Cytotoxic activity of volatiles from four Astragalus species. *Comptes Rendus l'Academie Bulgare des Sciences* 2007; 60: 1023–6.
36. Krasteva I, Momekov G, Zdraveva P, Konstantinov S, Nikolov S. Antiproliferative effects of a flavonoid and

- saponins from *Astragalus hamosus* against human tumor cell lines. *Pharmacognosy Magazine* 2008; 4: 269.
37. Devi M, Sai GC, Ammunje DN, Pavadai P, Kunjiappan S, Jayaraman A. Identification of lead moiety to treat polycystic ovarian syndrome from *Ganoderma lucidum*: a computational approach. *Biointerface Res Appl Chem* 2023; 13: 1-20.
 38. Wang J, Yin T, Liu S. Dysregulation of immune response in PCOS organ system. *Front Immunol* 2023; 14: 1169232.
 39. Yang Z, Tang Z, Cao X, Xie Q, Hu C, Zhong Z, et al. Controlling chronic low-grade inflammation to improve follicle development and survival. *Am J Reprod Immunol* 2020; 84: e13265.
 40. Aboeldalyl S, James C, Seyam E, Ibrahim EM, Shawki HE-D, Amer S. The role of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome—a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 2734.
 41. Sayin NC, Gücer F, Balkanlı-Kaplan P, Yüce MA, Ciftci S, Küçük M, et al. Elevated serum TNF-alpha levels in normal-weight women with polycystic ovaries or the polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med* 2003; 48: 165–70.
 42. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 1989; 242: 237-9.
 43. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805–12.
 44. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2453–5.
 45. Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh-Bardei L, Nabiuni M. The effect of curcumin on TNF- α , IL-6 and CRP expression in a model of polycystic ovary syndrome as an inflammation state. *J Reprod Infertil* 2017; 18: 352.
 46. Verotta L, Guerrini M, El-Sebakhy NA, Assad AM, Toaima SM, Radwan MM, et al. Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation. *Planta Med* 2002; 68: 986–94.
 47. Huang N, Rizshsky L, Hauck C, Nikolau BJ, Murphy PA, Birt DF. Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry* 2011; 72: 2015–23.
 48. Lu J, He R, Sun P, Zhang F, Linhardt RJ, Zhang A. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. *Int J Biol Macromol* 2020; 150: 765-74.
 49. Okay G, Kırıcı P, Mavral N, Utkan Korun ZE, Annac E, Kaplan S. *Ganoderma lucidum* and *hypericum perforatum* exhibit anti-inflammatory, antioxidant, and anti-androgen effect in rat model of experimental polycystic ovarian syndrome. *Med Princ Pract* 2024; 33: 385–91.
 50. Vaez S, Parivir K, Amidi F, Rudbari NH, Moini A, Ammini N. Quercetin and polycystic ovary syndrome; inflammation, hormonal parameters and pregnancy outcome: A randomized clinical trial. *Am J Reprod Immunol* 2023; 89: e13644.
 51. Vakili S, Koohpeyma F, Samare-Najaf M, Namavar Jahromi B, Jafarinia M, Goharitaban S, et al. Investigating the effects of rosmarinic acid on ovarian tissue, inflammatory markers, and sex hormones in polycystic ovary syndrome rats. *Physiol Rep* 2025; 13: e70304.
 52. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219–46.
 53. Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2017; 40: 1–8.
 54. González F. Inflammation in polycystic ovary syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids* 2012; 77: 300–5.
 55. Parker J, Briden L, Gersh FL. Recognizing the Role of Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome: A Paradigm Shift from a Glucose-Centric Approach to an Insulin-Centric Model. *J Clin Med* 2025; 14: 4021.
 56. Wang Z, Zhai D, Zhang D, Bai L, Yao R, Yu J, et al. Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment. *Reprod Sci* 2017; 24: 682-90.
 57. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860–7.
 58. Tesz GJ, Guilherme A, Guntur KV, Hubbard AC, Tang X, Chawla A, et al. Tumor necrosis factor α (TNF α) stimulates Map4k4 expression through TNF α receptor 1 signaling to c-Jun and activating transcription factor 2. *J Biol Chem* 2007; 282: 19302–12.
 59. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012; 148: 852–71.

Original Article

Anti-inflammatory Effects of Astragalus Hamosus Extract Stabilized in a Chitosan/Alginate Hydrogel in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome

Hajyhosseinloo M¹ , Parvini Kohnesh Shahri M¹ , Ghazi Tabatabaei Z² 

¹Department of Biology, Ur.C., Islamic Azad University, Urmia, Iran, ²Department of Chemistry, Ah.C., Islamic Azad University, Ahar, I.R. Iran

e-mail: parvini29@iau.ac.ir

Received: 15/06/2025 Accepted: 17/10/2009

Abstract

Introduction: Polycystic ovary syndrome (PCOS), one of the most common endocrine disorders in women of reproductive age, is characterized by infertility, menstrual irregularities, hyperandrogenism, and the presence of ovarian cysts. Elevated levels of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 have been reported in PCOS patients. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory effects of Astragalus hamosus extract stabilized in a chitosan/alginate hydrogel on the expression of TNF- α and IL-6 genes in a rat model of PCOS. **Materials and Methods:** In this experimental study, 25 adult female Wistar rats were randomly allocated into five groups: healthy control, PCOS control, and three treatment groups. PCOS was induced by a single intramuscular injection of estradiol valerate (4 mg/kg). After 60 days, the treatment groups received oral administration of Astragalus hamosus extract stabilized in chitosan/alginate hydrogel at doses of 5, 10, and 15 mg/kg for four weeks. The relative expression of TNF- α and IL-6 genes in ovarian tissue was measured using qRT-PCR. **Results:** Treatment with Astragalus hamosus extract stabilized in chitosan/alginate hydrogel reduced the number of cystic follicles and increased the number of corpora lutea, indicating improved ovarian morphology. Furthermore, a significant downregulation of TNF- α and IL-6 gene expression was observed in all treated groups compared to the PCOS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The findings suggest that the protective effects of Astragalus hamosus extract stabilized in chitosan/alginate hydrogel in PCOS may be attributed, at least in part, to its anti-inflammatory activity through suppression of inflammatory gene expression.

Keywords: TNF- α , IL-6, Ovarian morphology, Astragalus hamosus extract, Chitosan/Alginate hydrogel, Polycystic ovary syndrome, Animal model