

بررسی اثر عصاره الکلی گیاه چای کوهی (*Stachys Lvandulifolia*) بر ساختار

اندومتر موش مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک

پویان پهلوانی*، سیدمهدی موسوی*، دکتر علیرضا راستگوی حقی**، حسین لاهوتیان***
دکتر فرزانه اثنی عشری****، دکتر زهره علیزاده*****

دریافت: ۹۴/۷/۱۱ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰

چکیده:

مقدمه و هدف: سندروم تخمدان پلی کیستیک (polycystic ovarian syndrome-PCOS) به عنوان شایع ترین اختلال غدد درون ریز در زنان محسوب میشود. عدم تخمک گذاری ناشی از PCOS عامل خطری عمده در ایجاد تغییرات اندومتر محسوب می گردد. چای کوهی گیاهی معطر بوده و از خانواده نعنائیان است که خواص استروژنیک آن اثبات شده است. این مطالعه اثر عصاره الکلی چای کوهی بر پارامترهای بافت شناسی اندومتر مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک در موش صحرایی را مورد بررسی قرار می دهد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۳۶ سر موش صحرایی نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۰۰-۱۷۰ گرم استفاده شد. برای القاء سندرم تخمدان پلی کیستیک از استرادیول والرات با دوز ۴ میلی گرم به صورت تزریق عضلانی به هر موش استفاده گردید. حیوانات به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل بدون دریافت دارو، گروه PCOS دریافت کننده حلال دارو، گروه های PCOS دریافت کننده عصاره چای کوهی با دوزهای ۲۲۵ mg/kg، ۴۵۰ و ۹۰۰ و گروه PCOS دریافت کننده کلومیفن سیترات با دوز ۱/۵ mg/kg. عصاره تهیه شده به صورت داخل صفاقی برای مدت ۴ سیکل استروس (۱۶ روز) به موش های مورد آزمایش به صورت داخل صفاقی تزریق شد. نمونه های بدست آمده از اندومتر توسط هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شده و تعداد غدد، ارتفاع سلول های غددی، قطر داخلی غدد، ضخامت اندومتر و ارتفاع سلول های پوششی آن و همچنین تغییرات پاتولوژیک اندومتر مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در گروه مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک افزایش ارتفاع سلول های پوششی اندومتر و سلول های اپی تلیال غدد، کاهش ضخامت اندومتر و قطر داخلی غدد ایجاد شد اما این تغییرات معنی دار نبود ($P>0.05$)، در حالی که پارامتر تعداد غدد در گروه PCOs به صورت معنی دار کاهش نشان داد ($P<0.05$). علاوه بر آن در ۴۰ درصد موش های گروه سندرم تخمدان پلی کیستیک تغییرات هیپرپلازیک دیده شد. درمان با چای کوهی با غلظت های مختلف و کلومیفن سیترات، متغیرهای ارتفاع سلول های پوششی اندومتر، ضخامت اندومتر، ارتفاع سلول های اپی تلیال غدد، قطر داخلی غدد و تعداد غدد را به گروه کنترل نزدیکتر کرد، البته این تغییرات معنی دار نبود ($P>0.05$) درمان با غلظت های ۹۰۰ mg/kg چای کوهی و کلومیفن به ترتیب منجر به کاهش هیپرپلازی در ۳۵ و ۳۳/۳ درصد حیوانات گردید.

نتیجه نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز عصاره چای کوهی به صورت وابسته به دوز موجب تغییر در بعضی از پارامترهای بافت اندومتر مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک در موش صحرایی می شود.

کلید واژه ها: استرادیول / اندومتر / چای کوهی / سندرم پلی کیستیک تخمدان / کلومیفن

* مرکز پژوهش دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

** استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** کارشناس ارشد بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

**** استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** دانشیار آناتومی مرکز تحقیقات اندومتر و اندومتریوزیس دانشگاه علوم پزشکی همدان (alizadeh@umsha.ac.ir)

مقدمه:

سندرم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovary Syndrome -PCOS) به عنوان شایع ترین اختلال غدد درون ریز در زنان محسوب میشود که ۱۰-۵٪ زنان سنین باروری و در حدود ۱ نفر از هر ۱۵ زن در سراسر دنیا را مبتلا می سازد (۱،۲). در این افراد توقف رشد فولیکول ها و در نتیجه تجمع فولیکول های کوچک، وجود فولیکول های کیستیک و افزایش حجم استرومای تخمدان مشاهده میشود (۱،۳). به علت عدم تخمک گذاری ناشی از این سندروم، اندومتر مدت طولانی تحت اثر تماس با استروژن و آثار میتوزنیک حاصل از آن بدون اثر مهارى پروژسترون فاز لوتئال قرار می گیرد (۴،۵). عدم تخمک گذاری ناشی از PCOS عامل خطری عمده در ایجاد هایپرپلازی و تغییرات ساختاری اندومتر محسوب می گردد که درگیر کننده ی غدد و استرومای اندومتر می باشد و ممکن است به عنوان پیشرو و مقدمه ای برای کارسینوم اندومتر محسوب گردد (۶،۷). این خطر در بیماران مبتلا به عدم تخمک گذاری طولانی مدت سه برابر جمعیت عمومی زنان است (۸).

روشهای درمانی متعددی برای کنترل و یا درمان علامتی سندرم تخمدان پلی کیستیک مطرح شده است. کلومیفن از جمله داروهای شیمیایی و اولین گزینه درمان جهت القا تخمک گذاری در بیماران مبتلا به PCOS می باشد. کلومیفن یک آنتی استروژن سنتتیک است که در هیپوتالاموس و هیپوفیز به گیرنده های استروژن متصل شده و باعث بلوک کردن اثر فیدبک منفی استروژن روی ترشح هورمون آزاد کننده گونادوتروپین می شود و منجر به افزایش ترشح گونادوتروپین ها از هیپوفیز و تخمک گذاری می گردد (۹).

با توجه به اینکه سنتز داروهای شیمیایی و کاربرد آنها در درمان بیماری ها باعث ایجاد مشکل پیچیده ای به نام اثرات جانبی داروها شده است، لذا امروزه میتوان شاهد گسترش روزافزون تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی، تجویز و کاربرد آنها در کشورهای مختلف جهان بود. گیاه چای کوهی (*stachys lavandulifolia*) از خانواده نعناعیان است که در دامنه ی کوه های ایران می روید. گل های آن به صورت سنبله های پنبه مانند و آبی مایل به بنفش است (۱۰). این گیاه به طور گسترده در درمان بی خوابی و اضطراب استفاده می شود و همچنین القای کننده

عادت ماهیانه، سقط آور، کاهنده ی مدت و شدت درد دیسمنوره اولیه و ضد درد روماتیسمی است (۱۱،۱۲). تجزیه شیمیایی گیاه چای کوهی نشان می دهد که این گیاه حاوی فلاونوئید ها، اتانوئیدها، تری پنوئیدها، ساپونین ها، کینین، ایریدوئید ها، فنولیک اسیدها، دیتیر پنوئیدها است (۱۱،۱۳). از جمله ترکیبات دیگر گیاه، میرسن (۲۰٪)، آلفا پی ژنین (۱۸٪)، گاما مورولن (۱۳/۲٪)، اگنول (۷٪) می باشد (۱۸-۱۴). اپی ژنین فلاونوئید از ترکیبات موجود در این گیاه، استروژنی است که در گیاهان آروماتیک وجود دارد (۱۹، ۱۶-۱۴). اگر چه این ترکیب نسبت به هومولوگ های ایزوفلانوئیدی خود فعالیت کمتری دارد اما خواص استروژنیک آن ثابت شده است (۱۶). ترکیبات استروژنی موجود در عصاره چای کوهی موجب اشغال گیرنده های استروژنی شده و باعث کاهش عملکرد استروژن می شود و به نظر می رسد این خاصیت بتواند عوارض ناشی از افزایش ترشح استروژن در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک را کاهش دهد. با توجه به شیوع سندرم تخمدان پلی کیستیک و اثرات آن بر اندومتر مقرر گردید تا تاثیر عصاره چای کوهی بر تغییرات بافتی اندومتر در موش های مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک بررسی و با تاثیر کلومیفن سیترا مقایسه گردد.

روش کار:

این مطالعه تجربی مداخله گر آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۳، در مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام گرفت و کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی این مرکز بود.

در این مطالعه از موش صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley به وزن ۲۰۰-۱۷۰ گرم استفاده شد. موش ها در حیوان خانه دانشکده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. همه حیوانات در قفس های مخصوص با بستر خاک اره جا داده شدند و دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی داشتند. برای اجرای این تحقیق موش های صحرایی انتخاب شدند که دارای دو الی سه دوره استروس منظم در طی دوازده الی چهارده روز مشاهده اسمیر واژینال بودند (۲۰).

تعیین سیکل استروس: جهت تعیین منظم بودن سیکل استروس و همچنین مرحله استروس از این سیکل،

مدت زمان لازم جهت ایجاد مدل PCOS ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات بود (۲۳،۲۴). برای اطمینان از ایجاد تخمدان پلی سیستیک بعد از این مدت اسمیر واژینال تهیه شد. وجود سلول های شاخی در اسمیر واژینال از علائم وجود کیست های فولیکولی در تخمدان است (۲۱). درمان دارویی: در این مطالعه حیوانات به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل که آب و غذای معمول را دریافت کرد، گروه شم که مبتلا به PCOS بوده و حلال دارو را دریافت نمود گروه تیمار (PCOS) تیمار شده با چای کوهی شامل سه گروه، گروه ۱: درمان با غلظت ۲۲۵ mg/kg چای کوهی، گروه ۲: درمان با غلظت ۴۵۰ mg/kg چای کوهی، گروه ۳: درمان با غلظت ۹۰۰ mg/kg چای کوهی بود. گروه های تیمار شده، چای کوهی را به صورت داخل صفاقی برای مدت ۱۶ روز (۴ سیکل استروس) دریافت نمودند. گروه PCOS دریافت کننده کلومیفن سیترات با دوز ۱/۵ mg/kg برای مدت ۱۶ روز (۱۷،۲۵).

برای گرفتن نمونه از شاخ رحم، بعد از بیهوشی و تشریح حیوانات قطعه میانی از یک شاخ رحم برداشته و توسط فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید. نمونه ها با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. لام های بدست آمده توسط میکروسکوپ نوری با استفاده از بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ عدسی شیئی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با استفاده از نرم افزار Motic plus 2.0، از مقاطع عکس گرفته شد. پارامترهای مورد نظر در ۵ مقطع مختلف و ۵ فیلد میکروسکوپی بررسی و از داده های بدست آمده میانگین گرفته شد.

پارامترهای مورد نظر به شکل زیر اندازه گیری شدند (۲۶).

- ضخامت سلول های اپی تلیال اندومتر: از لبه بخش لومینال اپی تلیوم تا غشا پایه و بر حسب میکرومتر اندازه گیری شد.

- ضخامت سلول های اپی تلیال غدد: از لبه بخش لومینال اپی تلیوم غدد تا غشا پایه و بر حسب میکرومتر اندازه گیری شد.

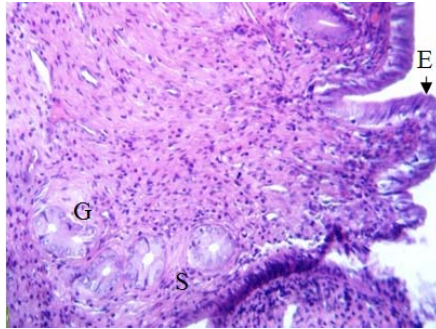
- ضخامت اندومتر: از لبه بخش لومینال اپی تلیوم تا لایه میومتریوم اندازه گیری شد و حسب میکرومتر بیان شد.

- تعداد غدد: در کل مقطع شاخ رحم شمارش گردید. از هر نمونه ۵ مقطع مختلف به طور تصادفی انتخاب شد و سپس تعداد غدد شمارش گردیده و میانگین گرفته شد.

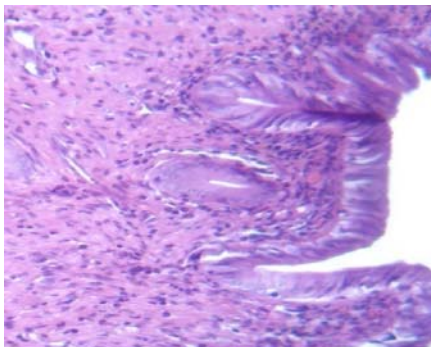
از اسمیر واژینال استفاده شد. برای گرفتن اسمیر واژینال ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی را توسط سر سمپلر به آرامی در واژن حیوان تزریق کرده و سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و روی لام قرار داده و اسمیر تهیه شد. نمونه برداشت شده بلافاصله توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X بررسی گردید (سیکل استروس) موش های صحرائی ماده ۴ روز طول میکشد و دارای مراحل پرواستروس، استروس، مت استروس و دای استروس می باشد و هر مرحله با نسبت خاص سلول های شاخی، اپی تلیالی با هسته، اپی تلیالی بدون هسته و لوکوسیت ها مشخص می گردد (۲۱). موش هایی که دارای چهار مرحله فوق، در چهار روز متوالی بودند دارای سیکل منظم در نظر گرفته می شدند. موش هایی که در مرحله استروس سیکل تولید مثلی خود قرار داشتند برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در این مرحله از سیکل دارای سلول های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول های اپی تلیال بوده و فاقد لوکوسیت می باشد (۲۱،۱۷).

تهیه عصاره گیاه چای کوهی: گیاه چای کوهی از باغ گیاهان دارویی دانشگاه بوعلی سینا تهیه شد، عصاره گیاه به این روش تهیه گردید: بعد از خشک کردن اندام هوایی گیاه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جهت عصاره گیری (عصاره ۲۰ درصد)، ۵۰۰cc اتانول ۷۵٪ بر روی ۱۰۰ گرم از پودر گیاه ریخته شد و هر ۲ ساعت یکبار و هر بار ۳۰-۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد، تا مواد موثره بهتر خارج شود، ۴۸ ساعت بعد با استفاده از کاغذ صافی مخصوص، محلول صاف و این عمل ۲ بار تکرار شد و مجموعه حاصل به دستگاه تقطیر در خلا منتقل و به میزان یک سوم مقدار اولیه تغلیظ گردید. الکل مورد استفاده در این روش تبخیر شده و لذا بر نتیجه آزمایش بی تاثیر بود. در نهایت عصاره ی حاصل در حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شد (۱۱). جهت تزریق، عصاره خشک شده با روغن ذرت مخلوط و غلظت مناسب تهیه گردید.

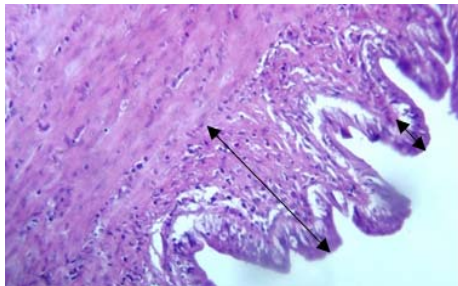
تهیه مدل حیوانی با تخمدان پلی کیستیک: برای القاء سندرم تخمدان پلی کیستیک از پروتکل Lee JC و همکاران استفاده شد (۲۲). بدین ترتیب که استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان- تهران) به میزان ۴ میلی گرم به صورت داخل عضلانی و یکبار به حیوانات تزریق گردید.



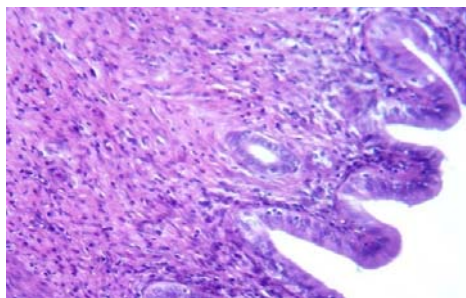
کنترل



PCOS



کلومیفن سیترات



دوز ۲۲۵ mg/kg چای کوهی

شکل ۲: مقاطع اندومتر از گروه کنترل، PCOS، کلومیفن سیترات و دوز ۲۲۵ mg/kg چای کوهی (۴۰۰ X).

در گروه کنترل سلول های اپی تلیال (E) و استرومای اندومتر (S) که حاوی غدد (G) است نشان داده شده است. محدوده اندازه گیری ارتفاع اندومتر (پیکان بلند) و ضخامت سلول های اپی تلیال (پیکان کوتاه) در گروه کلومیفن نشان داده شده است.

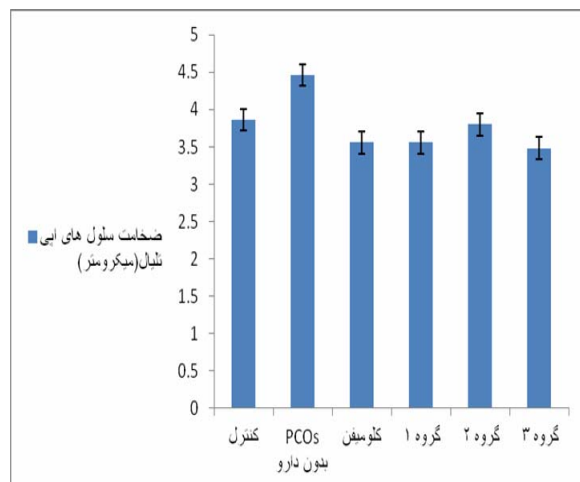
- هایپرپلازی: هایپرپلازی اندومتر با افزایش اندازه و اشکال متفاوت غدد تشخیص داده شد.

بعد از اندازه گیری پارامترهای فوق، داده ها در گروه های تجربی با یکدیگر و با گروه کنترل مربوطه مقایسه شدند. آمار و آنالیز: برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش شانزدهم و آزمون یک طرفه ANOVA جهت مقایسه متغیرهای کمی و از تست کی دو برای مقایسه متغیرهای کیفی در بین گروه ها استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ به عنوان معیار معنادار بودن اختلاف ها در نظر گرفته شد.

نتایج:

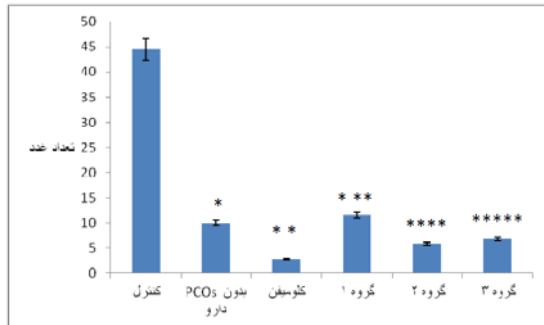
پاتولوژی اندومتر: در گروه مبتلا به PCOS، اندومتر ۴۰٪ از حیوانات شکل غیر طبیعی (هایپرپلازیک) داشت، در حالی که این میزان برای گروه دریافت کننده عصاره چای کوهی با دوز ۲۲۵ mg/kg و ۴۵۰ و ۴۰٪ و برای گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۹۰۰ mg/kg، ۳۵٪ و در مورد گروه دریافت کننده کلومیفن ۳۳/۳٪ بود.

ضخامت سلول های اپی تلیال اندومتر: ساختار بافتی اندومتر و نتایج بدست آمده از اندازه گیری ضخامت سلول های اپی تلیال در شکل ۱ و ۲ آمده است. بررسی های آماری تفاوت معنی داری را در بین گروه های مختلف و آزمایش نشان نداد ($P=0.06$).



شکل ۱: میانگین ضخامت سلول های اپی تلیال اندومتر در گروه های کنترل و آزمایش.

بررسی های آماری نشان دهنده تفاوت معنی دار در بین گروه های مختلف آزمایش و کنترل بود ($P=0.001$). تست های آماری نشان داد این تفاوت بین گروه کنترل با گروه شم و همچنین با کلیه گروه های درمان می باشد ($P<0.005$).



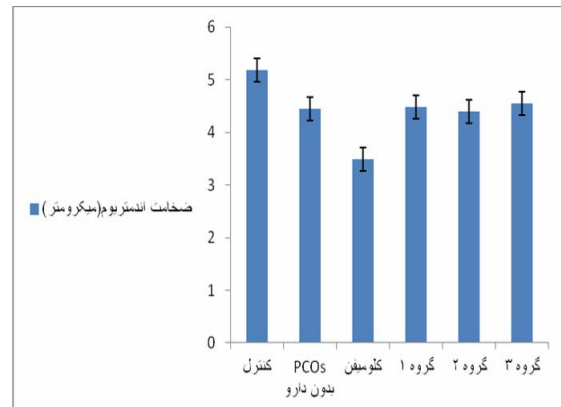
شکل ۵: میانگین تعداد غدد در گروه های آزمایش و کنترل
 $P=0.005$, $** P= 0.001$, $*** P= 0.01$, $****P= 0.002$,
 $*****P= 0.002$

بحث:

زنان مبتلا به بیماری تخمدان پلی کیستیک علائمی مانند اختلالات قاعدگی، هیپرآندروژنیسم را نشان می دهند. تاثیرات افزایش اندروژن ها بر عملکرد اندومتر موجب نازایی در زنان مبتلا به PCOS می شود. اندروژن ها رشد سلولی اندومتر و فعالیت ترشحاتی آن را مهار می کنند (۲۷). شناخت علل اصلی ناباروری و طرح ریزی انتخاب روش درمانی مناسب که از نظر هزینه و زمان برای بیماران مبتلا به PCOS مناسب باشد، در اولویت های تشخیصی و درمانی دارای اهمیت بسیاری است. مطالعات زیادی در جهت کاهش و جلوگیری از این عوارض صورت پذیرفته است اما با توجه به کمبود مطالعات بر روی اثرات داروهای گیاهی بر روی این بیماری، بر آن شدیم تا اثرات گیاه چای کوهی را بر تغییرات ساختاری اندومتر ناشی از سندرم پلی کیستیک تخمدان بسنجیم.

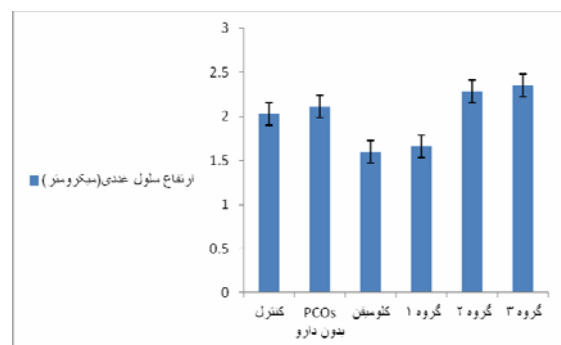
مطالعه ساختار بافتی اندومتر در مطالعه حاضر نشان داد که در گروه مبتلا به سندرم پلی کیستیک تخمدان، تغییراتی مانند افزایش ارتفاع سلول های اپی تلیال اندومتر و سلولهای اپی تلیال غدد، کاهش ضخامت اندومتر و تعداد غدد وجود دارد. این تغییرات در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است (۲۸، ۲۹). این شرایط میتواند زمینه ای برای ایجاد هایپرپلازی در رحم باشد که در مطالعات مختلف گزارش شده است (۳۱-۲۹). نتایج مربوط به

تعیین ضخامت اندومتر (شکل ۲): نتایج بدست آمده از اندازه گیری ضخامت اندومتر نشان دهنده کاهش در گروه PCOS و سپس افزایش در گروه های درمان شده توسط چای کوهی بود (شکل ۳). بررسی های آماری تفاوت معنی دار بین گروه درمان شده با کلومیفن و گروه سالم نشان داد ($P=0.01$).



شکل ۳: میانگین ضخامت اندومتر در گروه های آزمایش و کنترل

ضخامت سلول های اپی تلیال غدد: نتایج بدست آمده از اندازه گیری ضخامت این سلول ها نشان داد که ارتفاع این سلول ها در گروه PCOS افزایش و در گروه های درمان شده با کلومیفن و دوز ۲۲۵ چای کوهی کاهش می یابد (شکل ۴). بررسی های آماری تفاوت معنی داری را در بین گروه های مختلف آزمایش نشان نداد ($P=0.07$). (شکل ۱)



شکل ۴: ضخامت سلول های اپی تلیال غدد در گروه های آزمایش و کنترل

تعداد غدد: نتایج بدست آمده از اندازه گیری تعداد غدد نشان دهنده این بود که تعداد غدد به مقدار قابل توجهی در گروه PCOS کاهش و سپس در گروه درمان با چای کوهی با غلظت ۲۲۵ افزایش یافته است (شکل ۵).

استروژنی شده و باعث کاهش عملکرد استروژن می شود. از طرفی نشان داده شده است که اپی ژنوم فلانوئید موجود در عصاره این گیاه در شرایط *in vivo* ساخت گیرنده های استروژنی را در اندومتر موش کاهش می دهد (۱۹). اگر چه این ترکیب نسبت به هومولوگ های ایزوفلانوئیدی خود فعالیت کمتری دارد اما خواص استروژنیک آن ثابت شده است (۱۶،۳۶). در مورد متابولیسم این فلانوئید مطالعه رومانوف و همکاران نشان می دهد اپی ژنوم بعد از ۳۰ دقیقه پس از تزریق در پلازما قابل تشخیص است (۳۷). همچنین گرادولاتو و همکاران متابولیسم این ماده را بعد از تزریق به موش صحرایی بررسی کردند و نشان دادند که اپی ژنوم متابولیسمی آرام داشته و به آرامی جذب می شود و احتمال انباشتگی این فلانوئید در بدن وجود دارد (۳۸). از طرفی صفایی و همکاران عصاره آبی و هیدروالکلی چای کوهی را با هم مقایسه کرده و نشان دادند که میزان اپی ژنوم عصاره هیدرو الکلی بیشتر است (۳۹). با توجه به این یافته ها می توان حدس زد که حضور این ترکیب در عصاره چای کوهی موجب تغییرات در ساختار اندومتر حیوانات مبتلا به PCOS شده است. در اغلب پارامترهای مورد مطالعه نتایج به دست آمده از تاثیر چای کوهی نتایجی مشابه با تاثیر کلومیفن سیترات را نشان داد. این یافته بیانگر این مساله است که عصاره توانسته است اثری مشابه با داروی شناخته شده ی کلومیفن بر روی اندومتر بگذارد. نشان داده شده است که کلومیفن با تغییر پارامترهای اندومتر موجب کاهش عوارض ناشی از سندرم تخمدان پلی کیستیک می گردد (۲۹).

مقایسه نتایج حاصل از اثرات این دو نوع دارو تفاوت معنی داری را نشان نداد. در مورد پارامتر ضخامت اندومتر، غلظت های مختلف چای کوهی موجب افزایش ضخامت اندومتر شده در حالیکه این تاثیر در مورد کلومیفن دیده نشد. ممکن است این نتیجه مربوط به غلظت مورد استفاده در کلومیفن سیترات در مطالعه حاضر باشد.

مطالعه تعداد غدد نشان داد که تعداد آن ها در گروه PCOS به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است و نه تنها عصاره گیاهی که حتی کلومیفن سیترات نیز علی رغم افزایش قادر به برگرداندن تعداد غدد اندومتر نیست. علت این امر نیاز به مطالعه بیشتر و استفاده از دوزهای دیگر چای کوهی می باشد.

بررسی بافت اندومتر در مطالعه حاضر نیز تغییرات هیپرپلازیک در اندومتر ۴۰٪ از موش های مبتلا به پلی کیستیک تخمدان را نشان داد.

هم راستا با مطالعه حاضر در مطالعات انسانی نیز کاهش تعداد غدد و افزایش ارتفاع سلول های اپی تلیال غددی گزارش شده است (۲۹،۳۲). پراکانت اسموت و همکاران درصد هیپرپلازی اندومتر در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک را ۱۷/۳ درصد اعلام کردند (۳۳). تغییرات مشاهده شده در اندومتر موش های مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک می تواند به دلیل تغییرات هورمونی ناشی از این سندرم باشد (۲۹،۳۱،۳۴). به علت عدم تخمک گذاری ناشی از سندرم پلی کیستیک تخمدان، اندومتر برای مدت طولانی تحت تاثیر استروژن و آثار میتوژنیک آن بدون اثرات مهاري پروژسترون قرار می گیرد. به همین دلیل عدم تخمک گذاری موجب تاثیر بر بافت اندومتر و ایجاد اثرات هیپرپلازیک در آن می شود (۲۹).

در ارتباط با دو پارامتر ارتفاع اپی تلیوم و ضخامت اندومتر می توان گفت افزایش ارتفاع اپی تلیوم الزامی نباید همراه با افزایش ضخامت اندومتر باشد. اندومتر رحم از دو لایه شامل اپی تلیوم و استروما ساخته شده است که می توان گفت حجم بیشتر ضخامت اندومتر را استروما تشکیل داده و کاهش ضخامت اندومتر در مطالعه حاضر می تواند مربوط به کاهش استروما باشد.

بعد از استفاده از چای کوهی با دوزهای مختلف پارامترهای مورد مطالعه یعنی ضخامت اندومتر، ارتفاع سلول های اپی تلیال و ارتفاع سلول های غددی در موشهای مبتلا به PCOS تغییر یافته و به حالت طبیعی نزدیک می شود. اگر چه این نتایج از نظر آماری معنی دار نبودند. در مورد تغییرات هیپرپلازیک اندومتر نیز نتایج نشان داد که استفاده از دوز ۹۰۰ mg/kg باعث کاهش این تغییرات شده البته کلومیفن تاثیر بیشتری را نشان داد.

مطالعات دیگر مانند مطالعه فضایی و همکاران که تاثیر عصاره رازیانه را بر ساختار بافتی رحم در موش های مبتلا به PCOS مورد بررسی قرار دادند نیز نتایج مشابهی را با مطالعه حاضر نشان می دهد. رازیانه نیز مانند چای کوهی دارای ترکیبات فیتو استروژنی است (۳۵).

علت مشاهده تغییرات ایجاد شده بعد از استفاده از چای کوهی می تواند ترکیبات استروژنی موجود در عصاره چای کوهی باشد. این ترکیبات موجب اشغال گیرنده های

نتیجه نهایی :

در نهایت این مطالعه نشان داد که تزریق چای کوهی می تواند اثرات ترمیمی بر اندومتر در سندرم پلی کیستیک تخمدان داشته باشد.

سپاسگزاری :

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب کمیته

تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد. بدینوسیله از همکاری عزیزانی که در انجام آن با ما همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

- Makker A, Goel MM, Das V, Agarwal A. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an update. *Gynecol Endocrinol* 2012;28(3):175-81.
- Moradi S, Darvishi N. Evaluation of the Prevalence of Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome Referred to the Institute of Endocrine and Metabolism. *Razi J Med Sci* 2009;16(63):
- Velazquez E, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck C. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994;43(5):647-54.
- Cheung AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2001;98(2):325-31.
- Clark TJ, Neelakantan D, Gupta JK. The management of endometrial hyperplasia: an evaluation of current practice. *Eur J Obstet Gynecol Reproduc Biol* 2006;125(2):259-64.
- Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Obstetric Gynecol Surv* 1986;41(1):58-61.
- Horn LC, Schnurrbusch U, Bilek K, Hentschel B, Eienkel J. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14(2):348-53.
- Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P. Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Human Fertil* 2000;3(2):101-5.
- Shao R, Nutu M, Weijdegård B, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Karlsson-Lindahl L, et al. Clomiphene citrate causes aberrant tubal apoptosis and estrogen receptor activation in rat fallopian tube: implications for tubal ectopic pregnancy. *Biol Reproduc* 2009;80(6):1262-71.
- Jalilian N, Modarresi M, Rezaie M, Ghaderi L, Bozorgmanesh M. Phytotherapeutic management of polycystic ovary syndrome: role of aerial parts of wood betony (*stachys lavandulifolia*).
- Phytother Res 2013;27(11):1708-13.
- Jafarzadeh L, Asgari A, Golshan-Iranpoor F, Kheiri S, Parvin N, Rafieian M, et al. Abortifacient effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl in mice. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2010;11(4):26-31. (Persian)
- Mirabi P, Alamolhoda SH, Esmailzadeh S, Mojab F. Effect of medicinal herbs on primary dysmenorrhoea-a systematic review. *Iranian J Pharmaceutical Res* 2014;13(3):757.
- Oner G, Ozcelik B, Ozgun MT, Serin IS, Ozturk F, Basbug M. The effects of metformin and letrozole on endometriosis and comparison of the two treatment agents in a rat model. *Human Reproduc* 2010:deq016.
- Hertog MG, Hollman PC, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agricul Food Chem* 1992;4(12):2379-83.
- Morteza - Semnani K, Akbarzadeh M, Changizi S. Essential oils composition of *Stachys byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* and *S. laxa* from Iran. *Flavour Jragrance J* 2006;21(2):300-3.
- Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett* 1998;130(1):209-16.
- Kafali H, Iriadam M, Ozardalı I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 2004;35(2):103-8.
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Sedighifar S. Analgesic and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic, polyphenolic and boiled extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Res Pharmaceut Sci* 2007;1(2):92-8.
- Breinholt V, Hossaini A, Svendsen GW, Brouwer C, Nielsen S. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 2006;38(7):555-64.
- Kouchesfahani HM, Nabyooni M, Adham H. Investigating the therapeutic effect of bee venom on polycystic ovarian syndrome in rats. *Pajoohandeh J* 2010;15(1):1-6. (Persian)
- Bekyürek T, Liman N, Bayram G. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Lab*

- Animal 2002;36(1):51-60.
22. Lee JC, Pak SC, Lee SH, Lim SC, Bai YH, Jin CS, et al. The effect of herbal medicine on nerve growth factor in estradiol valerate-induced polycystic ovaries in rats. *Am J Chinese Med* 2003;31(06):885-95.
 23. Pak SC, Kim S-E, Oh D-M, Shim KM, Jeong MJ, Lim SC, et al. Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. *Arch Pharmacol Res* 2009; 32(3): 347-52.
 24. Lara H, Dissen G, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler J, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat 1. *Endocrinology*. 2000;141(3):1059-72.
 25. Ayaz A, Alwan Y, Farooq MU. Metformin—clomiphene citrate vs. clomiphene citrate alone: Polycystic ovarian syndrome. *J Human Reprod Sci* 2013;6(1):15.
 26. Alizadeh Z, Kheradmand Z, Bahmanzadeh M, Sohrabi M, Esna Ashari F, Dehghan AD. Endometrial morphology following repeated ovarian stimulation in mouse. *Tehran Univ Med J* 2014;72(6):389-95. (Persian)
 27. Vanky E, Salvesen K, Heimstad R, Fougner K, Romundstad P, Carlsen S. Metformin reduces pregnancy complications without affecting androgen levels in pregnant polycystic ovary syndrome women: results of a randomized study. *Human Reprod* 2004;19(8):1734-40.
 28. Shao R, Li X, Feng Y, Lin J-F, Billig H. Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33:41.
 29. Lopes IMRS, Baracat MCP, Simões MdJ, Simões RS, Baracat EC, Soares Jr JM. Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2011; 57(6):702-9.
 30. Balen A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Human reproduction update* 2001; 7(6): 522-5.
 31. Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Part I. *Fibre Toxicol*. 2011;8(1):18.
 32. Eid SM, Shakweer MM. Effect of late luteal phase clomiphene citrate on ovulation induction and endometrial blood flow in patients with polycystic ovary syndrome. *Clin Med Diag* 2014; 4(4):65-70.
 33. Prakansamut N, Sirayapiwat P, Triratanachai S. The percentages of endometrial hyperplasia and endometrial cancer among polycystic ovary syndrome (PCOS) patients presenting with abnormal menstrual pattern. *J Med Assoc Thailand=Chotmaihet thangphaet* 2014;97(2):159-64.
 34. Savaris RF, Groll JM, Young SL, DeMayo FJ, Jeong J-W, Hamilton AE, et al. Progesterone resistance in PCOS endometrium: a microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(6):1737-46.
 35. Fozalae SS, Farokhi F. The effect of metformin and aqueous extract foeniculum vulgare (fennel) on endometrial histomorphometry and the level of steroid hormones in rats with polycystic ovary syndrome. *Qom Univ Med Sci J* 2015; 8(5):
 36. Hiremath SP, Badami S, Hunasagatta SK, Patil SB. Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur J Pharmacol* 2000;391(1):193-7.
 37. Romanová D, Grančai D, Józová B, Božek P, Vachálková A. Determination of apigenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatograph A* 2000;870(1):463-7.
 38. Gradolatto A, Basly JP, Berges R, Teyssier C, Chagnon MC, Siess MH, et al. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Disposition* 2005;33(1):49-54.
 39. Safaei A. Identification and quantitative determination of luteolin and apigenin in the aerial parts and an extract of *Stachys lavandulifolia* by HPLC. *Iranian J Pharmaceut Res* 2010;90:

Original Article

Study of the Effects of *Stachys Lvandulifolia* Alcoholic Extract on Histomorphometry of Endometrium in Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model

P. Pahlevani^{*} ; S.M. Mosavi^{*} ; A.R. Rastgoo Haghi, M.D.^{**} ; H. Lahotian, M.Sc.^{***}
F. Esna Ashari, M.D.^{****} ; Z. Alizadeh, Ph.D.^{*****}

Received: 3.10.2015

Accepted: 29.2.2016

Abstract

Introduction & Objective: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrinopathy affecting women. Chronic anovulation due to polycystic ovary syndrome predisposes women to endometrial changes. *Stachys lavandulifolia* is an aromatic plant belonging to the Labiatae family proven to have estrogenic properties. In this study, we evaluated the effects of *Stachys lavandulifolia* extract on endometrial histological parameters in a rat model of PCOS.

Materials & Methods: Thirty-six adult female Sprague-Dawley rats, weighing between 17-200 g were used in this experimental study. PCOS was induced by a single intramuscular injection of 4 mg Estradiol Valerate. The rats were divided into six groups; control group with no treatment, the PCOS group receiving solvent, three PCOS groups treated by multiple doses (225, 450, 900 mg/kg) of *Stachys lavandulifolia* extract, and PCOS group receiving clomiphene citrate (1.5 mg/kg). Extracts were injected intraperitoneally for a period of 4 estrous cycles (16 days). The endometrial biopsies were stained with Hematoxylin-Eosin and then the number of glands, endometrial glandular cell height, internal diameter of glands, height of epithelial cells and height of endometrium and pathological changes were examined.

Results: The results showed that the height of surface epithelium and glandular epithelium increased and the endometrial thickness and internal diameter of glands insignificantly decreased in PCOS group compared to control ($P>0.05$) while the number of glands showed significant decrease ($P=0.01$). In addition, 40% of the rats in PCOS group showed endometrial hyperplasia. Treatment with clomiphene citrate and different concentrations of the *Stachys lavandulifolia* led height of glandular epithelium, internal diameter of glands, height of surface epithelium and endometrium and number of glands to become more similar to the control group, although they were not significant ($P>0.05$). Treatment with clomiphene citrate and 900 mg/kg concentrations of the *Stachys lavandulifolia* reduced hyperplasia in 35% and 33.3% of rats respectively.

Conclusion: The results of this study showed that *stachys lavandulifolia* dose dependently causes changes in the endometrial histological parameters of PCOS rat model.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (1):40-48*)

Keywords: Clomiphene / Endometrium / Estradiol / Polycystic Ovary Syndrome
Stachys Lavandulifolia

^{*} Students Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

^{**} Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{***} M.Sc. in Histology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{****} Assistant Professor, Department of Social Medicine, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{*****} Associate Professor of Anatomy, Endometrium & Endometriosis Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (alizadeh@umsha.ac.ir)