

Comparing the effect of aqueous extract of green tea and catechin on gonadotropins, β -estradiol, Progesterone, testosterone and ovarian follicle in polycystic ovarian syndrome rat model

Sayed Damoon Sadoughi¹, Raheleh Rahbarian²

Background and Aim: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine and metabolic disorder, which is characterized by ovulatory dysfunction and hyperandrogenism. Regarding to the antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) compounds, the present study was done to evaluate the effect of aqueous extract of green tea and catechin on the status of sex hormones and ovaries in polycystic ovarian syndrome rat model.

Materials and Methods: In this experimental study, 42 Wistar female rats were divided into 7 equal groups of control, PCOS control, PCOS treated with aqueous extract of green tea (50 and 100 mg/kg, 24 days, ip), PCOS treated with catechin (50 and 100 mg/kg, 24 days, ip) and PCOS treated with clomiphene citrate (1.5 mg/kg, 24 days, ip). Polycystic ovarian syndrome was induced by a single intramuscular injection of estradiol valerate (4 mg/kg). At the end of administration period, serum level of LH, FSH, β -estradiol, Progesterone, and testosterone was measured using ELISA. Also, the number of ovarian follicles was counted. The obtained data was analyzed using one-way ANOVA and Post Hoc Tukey statistical tests.

Results: Compared to PCOS control group, serum level of LH, β -estradiol, testosterone and number of cystic follicles in the groups treated with clomiphene citrate, treated with 100 mg/kg aqueous extract of green tea and treated with 50 and 100 mg/kg of catechin significantly decreased, but serum level of FSH, progesterone and number of preantral, antral, preovulatory follicles, and corpus luteum significantly increased ($p < 0.05$).

Conclusion: Compared with green tea, catechin has a more favorable effect on improving hormonal parameters, especially FSH hormone and increasing the number of ovarian follicles in rats with polycystic ovary syndrome.

Key Words: Polycystic Ovary Syndrome, Green Tea, Catechin, Ovarian Follicle, Rat

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (Supplementary: Biochemistry & Metabolism): 62-74.

Received: November 10, 2016

Accepted: February 7, 2017

¹ **Corresponding Author;** Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Email: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir Tel: +989153026313 Fax: +985138683001

² Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

مقایسه اثر عصاره آبی چای سبز و کاتچین بر سطح سرمی گنادوتروپین، استرادیول، پروژسترون، تستوسترون و فولیکول‌های تخمدان در موش صحرائی مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک

سید دامون صدوقی¹، راهله رهباریان²

چکیده

زمینه و هدف: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، یک اختلال اندوکرینی و متابولیکی پیچیده است که با اختلال تخمک‌گذاری و هایپراندرژنیسم شناسایی می‌شود. با توجه به خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات چای سبز (*Camellia sinensis*)، این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی چای سبز و کاتچین بر وضعیت هورمون‌های جنسی و تخمدان در موش صحرائی مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، تعداد 42 سر موش صحرائی ماده نژاد ویستار به 7 گروه مساوی شاهد، PCOS، PCOS تحت تیمار با عصاره آبی چای سبز (50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم، 24 روز، تزریق داخل صفاقی)، PCOS تحت تیمار با کاتچین (50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم، 24 روز، تزریق داخل صفاقی) و PCOS تحت تیمار با کلومیفن سیترات (1/5 میلی گرم بر کیلوگرم، 24 روز، تزریق داخل صفاقی) تقسیم شدند. سندرم تخمدان پلی کیستیک با یک بار تزریق عضلانی استرادیول والرات (4 میلی گرم بر کیلوگرم) القا شد. در پایان دوره درمان، سطح سرمی LH، FSH، استرادیول، پروژسترون و تستوسترون توسط روش الایزا سنجش شد؛ همچنین تعداد فولیکول‌های تخمدانی شمارش گردید. داده‌ها توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در مقایسه با گروه شاهد PCOS، سطح سرمی LH، استرادیول، تستوسترون و تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه‌های تحت تیمار با کلومیفن سیترات، غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی چای سبز و غلظت‌های 50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین به طور معنی‌داری کاهش یافت و سطح سرمی FSH، پروژسترون و تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال، آنترال، پره‌اوولاتوری و جسم زرد به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: در مقایسه با چای سبز، کاتچین اثر مطلوبی بر بهبود پارامترهای هورمونی به‌ویژه هورمون FSH و افزایش تعداد فولیکول‌های تخمدانی در موش‌های صحرائی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک دارد.

واژه‌های کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، چای سبز، کاتچین، فولیکول تخمدان، موش صحرائی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (ویژه‌نامه: بیوشیمی و متابولیسم): 62-74.

پذیرش: 1395/11/19

دریافت: 1395/08/20

¹ نویسنده مسؤول؛ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

آدرس: مشهد - بلوار معلم - معلم 71 - دانشگاه پیام نور - گروه زیست‌شناسی.

تلفن: 09153026313، شماره: 05138683001، پست الکترونیکی: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

² گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک¹، یکی از شایع ترین اختلالات هورمونی و اختلال عملکردی تخمدان زنان در سنین باروری است. در این بیماری، ترشح بیش از حد² آندروژن های تخمدانی، افزایش نسبت LH² به FSH³ و طیف وسیعی از علایمی مانند: هیرسوتیسم، آکنه، الیگومنوره، آمنوره، عدم تخمک گذاری و حتی نازایی را به همراه دارد. از دلایل بروز سندرم تخمدان پلی کیستیک می توان به نقص در عملکرد محور هیپوتالاموس هیپوفیز، اختلال عملکرد تخمدان و تغییر فعالیت انسولین اشاره کرد. در واقع سندرم تخمدان پلی کیستیک با ترشحات غیرطبیعی گنادوتروپین ها⁴، افزایش تستوسترون⁵ و پیش سازهای استروژن⁶ یعنی آندروستندیون⁷ همراه است (1).

میزان ترشح هورمون LH به طور ویژه در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک افزایش می یابد. زمانی که غلظت هورمون LH در مقایسه با FSH افزایش یابد، تخمدان ها سنتز آندروژن ها را افزایش می دهند. افزایش مقادیر آندروژن های آزاد در سرم خون، مانع رشد مناسب فولیکول های تخمدانی می شود (2). مشخص شده است در مبتلایان به تخمدان پلی کیستیک، فولیکول های تخمدانی تا مرحله آنترال پیش می روند و پس از آن روند تکوین فولیکول ها متوقف می شود. در ادامه، فرایند آپوپتوز در سلول های گرانولوزا شروع شده و با آتروزی فولیکول ها، فولیکول های کیستیک و آترتیک تشکیل می شود (3).

یکی از دلایل عدم تخمک گذاری در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک، افزایش پایداری کلاژن در دیواره فولیکول ها می باشد. تحقیقات نشان داده است کاهش کلاژن در دیواره فولیکول ها در زمان تخمک گذاری برای

رها سازی تخمک لازم است. در این فرآیند متالوپروتئینازهای ماتریکس خارج سلولی که منجر به تفکیک کلاژن می شوند، افزایش یافته و لیزیل اکسیداز که یک متصل کننده متقابل بین کلاژن و الاستین است، کاهش می یابد. در پاسخ به افزایش ساخت آندروژن ها در نتیجه افزایش ترشح هورمون LH در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک، فعالیت متالوپروتئینازهای ماتریکس خارج سلولی به طور معنی داری کاهش و از طرفی فعالیت لیزیل اکسیداز افزایش می یابد؛ در نتیجه تخریب کلاژن کاهش و تخریب غشای فولیکول مهار می شود. این امر یکی از مکانیسم های سلولی عدم تخمک گذاری در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی کیستیک را نشان می دهد (4).

درمان های متعددی برای بهبود عوارض سندرم تخمدان پلی کیستیک پیشنهاد شده است که یکی از آنها تجویز داروی کلومیفن سیترات است. کلومیفن سیترات، یک آنتی استروژن سنتتیک است که در هیپوتالاموس و هیپوفیز به گیرنده های استروژن متصل شده و منجر به مهار اثر بازخور منفی استروژن روی ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین می شود. در نتیجه ترشح گنادوتروپین ها از هیپوفیز افزایش یافته و تخمک گذاری القا می شود (5). مقاومت به کلومیفن سیترات در مبتلایان به تخمدان پلی کیستیک همراه با عوارض جانبی نظیر: بزرگ شدن تخمدان، بروز سندرم قبل از قاعدگی، تکوین همزمان چندفولیکول و چندقلو زایی، کاهش ضخامت اندومتر، همچنین گرگرفتگی، تهوع، استفراغ و سردرد، باعث شده است در درمان تخمدان پلی کیستیک، شناسایی و تهیه داروهای جایگزین از اهمیت بالایی برخوردار باشد (5).

شواهد نشان می دهد، سطوح بالای استرس اکسیداتیو موجب اختلال تخمک گذاری در مبتلایان به تخمدان پلی کیستیک می شود. همچنین در آسیب بافت تخمدان، افزایش تولید آندروژن های تخمدانی و ایجاد فولیکول های غیرطبیعی دخالت دارد. مطالعات، افزایش سطح بافتی شاخص های استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی را در

¹ Polycystic ovarian syndrome² Luteinizing hormone³ Follicle-Stimulating Hormone⁴ Gonadotropins⁵ Testosterone⁶ Estrogen⁷ Androstendion

سدیم آرسنیت، پراکسیداسیون لیپیدی را در اسپرم کاهش داده و بدین ترتیب از مرگ اسپرم‌ها جلوگیری می‌نماید (11). مصرف چای سبز احتمالاً در نکرور کبدی ناشی از استامینوفن نقش محافظتی دارد و سطح سرمی آلانین ترانسفراز و آسپارتات ترانسفراز را در موش‌های صحرایی مدل مسمومیت حاد کبدی ناشی از استامینوفن، کاهش می‌دهد (12). تحقیقات نشان داد مصرف چای سبز موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز در افراد مبتلا به دیابت نوع دو می‌شود. این امر نشان‌دهنده اثر آنتی‌اکسیدانی چای سبز می‌باشد و این خاصیت به کاتچین‌های آن نسبت داده شد (13). طبق تحقیقات انجام‌شده، چای سبز در کاهش سطح سرمی LH، تستوسترون و افزایش پروژسترون مؤثر است (14).

با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاربردهای متنوع چای سبز و ترکیبات مؤثر آن در طب سنتی، هدف از این مطالعه تعیین اثر عصاره آبی چای سبز و کاتچین بر سطح سرمی گنادوتروپین، استرادیول، پروژسترون¹، تستوسترون و تعداد فولیکول‌های تخمدانی در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بود.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی و آزمایشگاهی، از موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تعداد 42 سر موش صحرایی با محدوده وزنی 190 ± 8 گرم و سن تقریبی 85 ± 5 روز، از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد تهیه شد. حیوانات در دمای محیطی 24 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 35 ± 4 درصد و دوره روشنایی تاریکی 12 ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) قرار داشتند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی 500 میلی‌لیتری در اختیار آن‌ها قرار داده شد. همچنین از غذای

مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک گزارش کرده است (6). از این رو گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، از گذشته به عنوان مکمل مناسب برای کاهش عوارض داروهای شیمیایی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن مطرح شده‌است و مصرف آن‌ها رو به افزایش است.

چای سبز جزء شاخه Angiosperm، رده Dialypetalae، راسته Parital، خانواده Teacae و جنس Camellia می‌باشد و با نام علمی *Camellia sinensis* شناخته می‌شود. سه گروه عمده پلی‌فنل شامل: کاتچین‌ها، تئافلاوین‌ها و تئاروبیژن‌ها در چای سبز وجود دارد. کاتچین‌ها نوعی آنتی‌اکسیدان و از مهم‌ترین فلاونوئیدها به شمار می‌روند. کاتچین‌های چای سبز شامل: اپی‌کاتچین، اپی‌کاتچین‌گالات، اپی‌گالوکاتچین و اپی‌گالوکاتچین‌گالات می‌باشند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اپی‌گالوکاتچین‌گالات می‌باشد (7).

مطالعات نشان داد، چای سبز موجب تسریع روند التیام زخم‌های سوختگی و جراحی در موش‌های صحرایی می‌شود و این اثرات به خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات چای سبز نسبت داده شد (8). مشخص شده است، مصرف کاتچین‌های چای سبز موجب کاهش وزن می‌شود و خطر بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و دیابت را کاهش می‌دهد. همچنین با بهبود سطح سرمی پروفایل قندی و لیپیدی، نقش مهمی در کاهش عوارض مبتلایان به سندرم متابولیک دارد (9). گزارش شده است مصرف چای سبز می‌تواند سطح سرمی فاکتورهای التهابی مانند: CRP، IL-6 و TNF- α را در زنان مبتلا به دیابت نوع دو کاهش دهد (10). طی تحقیقات انجام‌شده، مشخص شد تجویز عصاره چای سبز می‌تواند قابلیت تحرک، مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لومن و ضخامت اپیتلیوم زایا را در موش‌های صحرایی مصرف‌کننده سدیم آرسنیت تا حدود زیادی بهبود بخشد. مشخص شد عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، با مهار استرس‌اکسیداتیو ناشی از

¹ Progesterone

(Brand, Germany)، به آرامی در واژن حیوان تزریق شد؛ سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مدل CX21FS1 (Olympus, Japan) با بزرگ‌نمایی 400 برابر بررسی شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولیدمثلی قرار داشتند، برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در مرحله استروس، دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی‌تلیال بوده و فاقد لوکوسیت است (16). لازم به ذکر است در این روش از بین 105 سر موش صحرایی ماده، 42 سر انتخاب شد.

تخمندان پلی‌کیستیک توسط یک‌بار تزریق داخل عضلانی استرادیول‌والرات (داروسازی ابوریحان، ایران) به میزان 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم، القا شد. مدت‌زمان لازم برای ایجاد مدل تخمدان پلی‌کیستیک، حدود 60 روز پس از تزریق استرادیول‌والرات بود. برای اطمینان از ایجاد تخمدان پلی‌کیستیک، اسمیر واژینال تهیه شد. وجود سلول‌های شاخی به میزان زیاد در اسمیر واژینال، از علائم وجود کیست‌های فولیکولی تخمدان است (17). همچنین از هر گروه، یک حیوان به صورت تصادفی انتخاب و پس از قربانی‌شدن با دوز کشنده دی‌اتیل‌اتر (Merck, Germany)، تخمدان‌ها خارج شدند. به دنبال طی مراحل پردازش بافتی و رنگ‌آمیزی تخمدان، کیست‌های تخمدانی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 40 برابر مشاهده و القای تخمدان پلی‌کیستیک در گروه‌های شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک و مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار، مورد تأیید قرار گرفت.

ضمناً از بطن چپ خونگیری انجام شد و بدون ماده ضد انعقاد به مدت 12 دقیقه در انکوباتور مدل INB400 (Mettler, Germany) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از وقوع انعقاد، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ مدل EBA280 (Hettich, Germany) به مدت 12 دقیقه با سرعت 5000 دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس سرم خون روی بخش لخته شده، توسط سمپلر مدل Transfette®S

فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه نمودند.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به 7 گروه (در هر گروه 6 سر موش صحرایی) شامل: گروه‌های شاهد سالم (تزریق داخل صفاقی 0/5 میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو)، شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک (تزریق داخل صفاقی 0/5 میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو)، مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار با عصاره آبی چای سبز با غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم (24) روز تزریق داخل صفاقی)، مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار با کاتچین (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم (24) روز تزریق داخل صفاقی) و مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار با 1/5 میلی‌گرم بر کیلوگرم کلومیفن‌سیترات (24) روز تزریق داخل صفاقی) (داروسازی ایران هورمون، ایران) تقسیم شدند.

عصاره آبی چای سبز با استفاده از دستگاه سوکسله مدل EME61000/CEB (Electrothermal, UK) تهیه شد. ابتدا 50 گرم پودر خشک‌شده برگ چای سبز داخل کاغذ کارتوش ریخته شد و در محل تعبیه‌شده دستگاه سوکسله قرار گرفت؛ سپس 400 میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان حلال در داخل بالن دستگاه ریخته شد. آب مقطر توسط گرم‌کن دستگاه به جوش می‌آید و در نهایت موجب جداسازی عصاره چای سبز می‌شود. کندانسور وظیفه سردکردن بخارات اضافی را بر عهده دارد؛ بنابراین کاهش حجم محلول بسیار آهسته می‌باشد. پس از حدود 10 ساعت مایع نسبتاً غلیظی در ته بالن جمع شد. سپس با حذف حلال در دمای 40 درجه سانتی‌گراد، حدود 4 گرم عصاره چای سبز به دست آمد (15).

برای اجرای این تحقیق، در ابتدا موش‌هایی انتخاب شدند که دارای 2 تا 3 دوره استروس منظم در طی 12 تا 14 روز مشاهده اسمیر واژینال، بودند. برای تعیین منظم بودن سیکل استروس، از اسمیر واژینال استفاده شد. ابتدا 0/3 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر مدل Transfette®S

اندازه‌گیری شد (18). لازم به ذکر است که محقق ارزیابی‌کننده، نسبت به گروه‌های اطلاع‌یافته و میانگین اعداد در 4 مرتبه تکرار شمارش فولیکولی، ملاک نتایج تحقیق قرار گرفت.

داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش 20) تحلیل شد. با توجه به اینکه نتایج به‌دست آمده کمی بود، توسط آزمون کلوموگرو-اسمیرنوف، فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد ($P > 0/05$). برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به‌همراه محاسبات آماری مربوطه، به‌صورت خطای معیار $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SEM) گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها 0/05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به‌دست آمده، سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد سالم، به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح سرمی هورمون‌های FSH و پروژسترون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). تجویز داخل صفاقی عصاره آبی چای سبز با غلظت 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، موجب کاهش معنی‌دار سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون و نیز افزایش معنی‌دار سطح سرمی هورمون‌های FSH و پروژسترون شد ($P < 0/05$). این مقایسه هورمونی بین گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک و گروه تحت تیمار با غلظت 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم چای سبز اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$).

تجویز داخل صفاقی کاتچین با غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان

دیگری منتقل و در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (15). سطح سرمی هورمون‌های مورد بررسی توسط روش ELISA، دستگاه الایزایدر مدل 2100 (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت فاین‌تست (Finetest, China) سنجش شد. کیت LH دارای حساسیت $< 0/938$ میلی‌واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده 100-1/563 میلی‌واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، FSH دارای حساسیت $< 1/406$ میلی‌واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده 150-2/344 میلی‌واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، استرادیول دارای حساسیت $< 0/422$ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده 45-0/703 نانوگرم بر میلی‌لیتر، پروژسترون دارای حساسیت $< 0/938$ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده 100-1/563 نانوگرم بر میلی‌لیتر، تستوسترون دارای حساسیت $< 0/188$ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده 20-0/313 نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

برای بررسی بافتی، ابتدا تخمدان‌ها از حفره شکمی خارج و با محلول سرم فیزیولوژی شستشو شدند؛ سپس در فرمالدئید 10 درصد (Merck, Germany) قرار گرفتند. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی، مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری طی شد و مقاطع 7 میکرونی تهیه و به‌روش هماتوکسیلین‌ائوزین رنگ‌آمیزی شد (15).

شمارش تعداد جسم زرد و دستجات فولیکولی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد. همچنین تعداد فولیکول‌های پرایمری¹، پره‌آنترال²، آنترال³، پره‌اوولوتوری⁴ و کیستیک⁵ توسط فرمول $F = (A \times B / C) \times D$ شمارش شد (F = تعداد کل فولیکول، A = تعداد هر نوع فولیکول در هر برش تخمدان، B = فاصله بین برش‌های شمارش شده، C = قطر اووسیت، D = ضخامت برش‌ها). در این مطالعه از هر 10 برش، یک برش برای شمارش فولیکول‌ها انتخاب شد؛ ضخامت برش‌ها 7 میکرون و قطر اووسیت با استفاده از عدسی چشمی مدرج

¹ Primary follicle

² Preantral follicle

³ Antral follicle

⁴ Preovulatory follicle

⁵ Cystic follicle

پلی کیستیک در مقایسه با شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، به صورت وابسته به دوز تزریقی موجب کاهش معنی دار سرمی هورمون های LH، استرادیول و تستوسترون و نیز افزایش معنی دار سطح سرمی هورمون های FSH و پروژسترون شد ($P<0/05$). مقایسه زوج سطح سرمی هورمون های LH، FSH، استرادیول، پروژسترون و تستوسترون بین گروه تحت تیمار با کلومیفن سیترا و گروه دریافت کننده غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین که مطلوب ترین اثر درمانی را در بین گروه های تحت تیمار با عصاره چای سبز و کاتچین داراست، اختلاف معنی داری نداشت ($P>0/05$). به عبارت دیگر تجویز غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین به موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک توانسته است تا حدودی اثر درمانی مشابهی با کلومیفن سیترا داشته باشد (جدول 1).

نتایج نشان داد تیمار موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک با کلومیفن سیترا در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، موجب کاهش معنی دار

جدول 1- مقایسه میانگین سطح سرمی هورمون های مورد بررسی به تفکیک گروه های مورد مطالعه

گروه/ پارامتر	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	استرادیول (ng/ml)	پروژسترون (ng/ml)	تستوسترون (ng/ml)
شاهد سالم	3/25±0/38	8/12±0/93	2/75±0/14	9/28±1/67	2/93±0/09
شاهد PCOS	^a 10/02±1/70	^a 3/08±0/41	^a 15/53±2/61	^a 2/09±0/18	^a 14/90±3/14
PCOS تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز	9/11±2/15	3/58±0/23	13/46±3/22	2/52±0/36	13/00±2/66
PCOS تیمار شده با غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز	^{bc} 7/42±1/71	^{bc} 4/23±0/55	^{bc} 9/55±3/17	^{bc} 3/84±1/05	^{bc} 10/95±3/35
PCOS تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین	^b 6/92±2/03	^b 4/82±1/03	^b 8/36±2/20	^b 5/15±1/40	^b 9/60±2/29
PCOS تیمار شده با غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین	^{bd} 5/84±1/31	^{bd} 5/74±0/33	^{bd} 6/93±1/60	^{bd} 6/61±1/52	^{bd} 7/38±2/26
PCOS تیمار شده با غلظت 1/5 میلی گرم بر کیلوگرم کلومیفن سیترا	^b 3/93±0/70	^b 7/83±0/98	^b 3/44±0/51	^b 8/84±2/17	^b 3/58±0/47
سطح معنی داری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه	0/011	0/018	0/001	0/021	0/002

داده ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است؛ ^a: $P<0/05$ در مقایسه با گروه شاهد، ^b: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار نشده، ^c: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز، ^d: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین

پلی کیستیک و گروه تحت تیمار با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم چای سبز، اختلاف معنی داری نداشت ($P>0/05$). تجویز داخل صفاقی کاتچین با غلظت های 50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم به موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، به صورت وابسته به دوز تزریقی، موجب افزایش معنی دار تعداد فولیکول های پره آنترال، آنترال، پره اوولاتوری و جسم زرد و همچنین موجب کاهش معنی دار تعداد فولیکول های کیستیک شد ($P<0/05$). این مقایسه برای تعداد فولیکول های پرایمری اختلاف معنی داری نداشت ($P>0/05$). پس از مقایسه زوج بین گروه های تحت تیمار با عصاره آبی چای سبز و کاتچین مشخص شد، غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین، بیشترین اثر را در افزایش تعداد دستجات فولیکولی موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک دارا بود.

بر اساس نتایج به دست آمده، تعداد فولیکول های پره آنترال، آنترال، پره اوولاتوری و جسم زرد در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی داری کاهش و تعداد فولیکول های کیستیک به طور معنی داری افزایش یافت ($P<0/05$). این مقایسه برای تعداد فولیکول های پرایمری، اختلاف معنی داری نداشت ($P>0/05$).

تجویز داخل صفاقی عصاره آبی چای سبز با غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم به موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، موجب افزایش معنی دار تعداد فولیکول های پره آنترال، آنترال، پره اوولاتوری و جسم زرد، کاهش معنی دار تعداد فولیکول های کیستیک ($P<0/05$) و عدم اختلاف معنی دار تعداد فولیکول های پرایمری شد ($P>0/05$). این مقایسه بین گروه شاهد مبتلا به تخمدان

جدول 2- مقایسه میانگین تعداد دستجات فولیکولی و جسم زرد به تفکیک گروه های مورد مطالعه

گروه / پارامتر	فولیکول پرایمری	فولیکول پره آنترال	فولیکول آنترال	فولیکول پره اوولیتوری	فولیکول کیستیک	جسم زرد
شاهد سالم	28/31±4/09	18/35±2/17	11/45±3/05	6/30±1/05	0	9/35±1/85
شاهد PCOS	a25/52±3/18	a3/87±0/67	a2/76±0/40	a1/33±0/41	a4/90±1/14	a1/55±0/33
PCOS تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز	24/78±3/21	4/15±1/30	3/40±1/55	1/63±0/42	4/55±0/83	2/11±0/19
PCOS تیمار شده با غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز	bc24/36±1/70	5/21±2/03 bc	bc5/22±1/13	3/00±0/66	3/84±1/20	bc2/90±0/42
PCOS تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین	b26/06±3/71	b6/51±2/17	b6/00±2/16	b3/63±1/11	b2/92±0/70	b4/26±0/96
PCOS تیمار شده با غلظت 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین	bd26/83±4/36	10/11±3/63 bd	bd7/40±3/13	bd4/15±1/19	bd1/89±0/23	bd6/15±1/61
PCOS تیمار شده با غلظت 1/5 میلی گرم بر کیلوگرم کلومیفن سیترا	b27/41±3/15	15/54±4/30 b	b9/47±2/25	b5/56±0/77	b1/11±0/43	b8/70±2/11
سطح معنی داری (آنالیز واریانس یک طرفه)	0/068	0/004	0/006	0/015	0/022	0/009

داده ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است؛ a: $P<0/05$ در مقایسه با گروه شاهد، b: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار نشده، c: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز، d: $P<0/05$ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تیمار شده با غلظت 50 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین

نتایج نشان داد، تیمار موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک با کلومیفن‌سیترات در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، موجب افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال، آنترال، پره اوولاتوری و جسم زرد و همچنین موجب کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های کیستیک شد ($P < 0/05$). این مقایسه برای تعداد فولیکول‌های پرایمری اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$) (جدول 2)

بحث

در پژوهش حاضر، اثر مقایسه‌ای عصاره آبی چای سبز و کاتچین بر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استرادیول، پروژسترون، تستوسترون و تعداد فولیکول‌های تخمدانی در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از استرادیول‌والرات برای القای مدل سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های صحرایی ماده استفاده شد. Shirwalkar و همکاران (2007) گزارش کردند، استرادیول‌والرات سبب اختلال در تنظیم گنادوتروپین‌های هیپوفیزی (افزایش نسبت LH به FSH) می‌شود و یا به‌طور مستقیم با اثر بر هیپوفیز، موجب کاهش فعالیت ترشحی سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیزی می‌گردد. همچنین می‌تواند از طریق اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز، نقش خود را ایفا نماید (19).

با توجه به نتایج به‌دست آمده، سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح سرمی هورمون FSH و پروژسترون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین در مقایسه با گروه شاهد، تعداد فولیکول‌های پره‌آنترال، آنترال، پره‌اوولاتوری و جسم زرد در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک به‌طور معنی‌داری کاهش و تعداد فولیکول‌های کیستیک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتایج تحقیقات نیبونی و همکاران (1393) گویای افزایش معنی‌دار LH، استرادیول و تستوسترون در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک است. همچنین مشخص شده است، استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تغییر ساختار فولیکولی، پرولیفراسیون و هیپرپلازی مزانشیم تخمدان در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دارد (20). علیزاده و همکاران (1394) دریافتند، تخمدان پلی‌کیستیک موجب کاهش FSH، پروژسترون و افزایش LH، استرادیول و تستوسترون می‌شود که در نهایت تخمک‌گذاری کاهش می‌یابد (21). طی تحقیقات انجام‌شده، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک موجب کاهش ضخامت لایه گرانولوزا، افزایش ضخامت غلاف فولیکولی و افزایش تعداد فولیکول‌های کیستیک در مقایسه با گروه شاهد می‌شود و تعداد اجسام زرد در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک کاهش می‌یابد. همچنین موجب کاهش فولیکول‌های پری‌آنترال، آنترال و جسم زرد در گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک می‌شود (20) که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر همسو می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، تیمار موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک با کلومیفن‌سیترات، موجب بهبود پارامترهای هورمونی و افزایش تعداد فولیکول‌های تخمدانی در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک شد. Casper (2009) گزارش کرد، مصرف کلومیفن‌سیترات می‌تواند در هیپوتالاموس به گیرنده‌های استروژن متصل شده و با مهار اثر بازخور منفی استروژن روی ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین، موجب تحریک ترشح FSH از هیپوفیز و بهبود تخمک‌گذاری در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک شود (5).

در این پژوهش مشخص شد، تیمار موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک با غلظت 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی چای سبز و غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم کاتچین، موجب کاهش معنی‌دار سطح

تخمندان پلی کیستیک باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، سطح سرمی LH پس از تجویز چای سبز و کاتچین کاهش و پروژسترون افزایش یافت. کاهش در LH می تواند ناشی از افزایش پروژسترون باشد که با تأثیر فیدبکی بر محور هیپوفیز - تخمدان موجب کاهش LH شده است. همچنین، افزایش سطح سرمی هورمون پروژسترون پس از دریافت چای سبز و کاتچین، خود تأییدی بر افزایش تخمگ گذاری در موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک است.

با توجه به اینکه سندرم تخمدان پلی کیستیک یک بیماری التهابی مزمن است و در آن سطح سایتوکاین های التهابی و شاخص های استرس اکسیداتیو تخمدان افزایش می یابد (3)، مشخص شده است ترکیبات چای سبز به ویژه کاتچین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، با مهار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، از تخریب بافتی جلوگیری می نمایند و نیز از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، موجب محافظت بافتی می شوند. همچنین پلی فنول های موجود در چای سبز به واسطه گروه های هیدروکسیل موجود در ساختار خود می توانند به رادیکال های آزاد متصل شده و آنها را مهار نمایند و نیز می توانند میزان آنتی اکسیدان های آندوژن و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز را افزایش دهند (24). Singh و همکاران (2010) دریافتند، چای سبز با اثرات ضد التهابی خود موجب کاهش سطح سرمی CRP، TNF α و IL-6 می شود و در شرایط التهابی اثرات خود را از طریق کاهش آزادسازی سایتوکاین های التهابی و مهار کاسپاس 3 اعمال می کند (25). در این مطالعه، شاخص های استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی در سطح سرمی و سطح بافتی تخمدان موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک تحت تیمار، مورد بررسی قرار نگرفت. ولی با توجه به گزارشات سایر محققین که بخشی از آن ذکر شد، می توان احتمال داد مصرف چای سبز و کاتچین می تواند با کاهش شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب، موجب بهبود اختلالات هورمونی

سرمی هورمون های LH، استرادیول و تستوسترون و افزایش سطح سرمی هورمون FSH و پروژسترون در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، گردید. همچنین در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی کیستیک، تیمار موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک با غلظت های مذکور عصاره آبی چای سبز و کاتچین، موجب افزایش معنی دار تعداد فولیکول های پره آنترال، آنترال، پره اووولاتوری و جسم زرد شد و تعداد فولیکول های کیستیک کاهش یافت.

مرشدی و همکاران (1395) به بررسی اثر چای سبز بر غلظت سرمی استروژن، پروژسترون و گنادوتروپین ها در موش های صحرایی ماده پرداختند. طی نتایج به دست آمده مشخص شد، چای سبز منجر به کاهش سطح سرمی LH، استروژن و افزایش پروژسترون می شود که با نتایج پژوهش حاضر همسو است؛ ولی عنوان شد چای سبز اثری بر سطح سرمی FSH ندارد. با توجه به اینکه برای سنتز استرادیول در سلول های گرانولوزای تخمدان، آنزیم آروماتاز نقش مهمی دارد، فلاونوئیدهای چای سبز تولید آنزیم آروماتاز را در سلول های گرانولوزا به صورت وابسته به دوز مصرفی، مهار و موجب کاهش تولید استرادیول می شوند (14).

در تأیید نقش کاتچین در مهار آنزیم آروماتاز، پژوهشی در زمینه تجویز خوراکی کاتچین به موش های صحرایی انجام شد و نتایج همسویی به دست آمد (22). Kao و همکاران (2000) دریافتند تیمار هفت روزه موش های صحرایی ماده با چای سبز، موجب کاهش سطح سرمی بتا استرادیول و LH می شود (23). همچنین مشخص شده است کاتچین با اثر بازخور منفی بر LH میزان تستوسترون را کاهش می دهد و با کاهش آندروژن، LH به میزان کمتری تولید شده و اثر غالب LH به FSH کاسته می شود (23). نتایج حاصل نیز این مطلب را تأیید کرده است و خود می تواند دلیلی بر راه اندازی مجدد مسیر طبیعی هورمون های چرخه جنسی و به احتمال زیاد بروز تخمگ گذاری در موش های صحرایی مبتلا به

تیمار شده با دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین دارای نزدیکترین نتایج به دست آمده در مقایسه با گروه دریافت کننده کلومیفن سیترات می باشد. بیشترین افزایش سطح سرمی هورمون FSH پس از تجویز دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم کاتچین و بیشترین تعداد دستجات فولیکولی، می تواند دلیلی بر این ادعا باشد. بنابراین می توان گفت چای سبز به ویژه ماده مؤثره آن کاتچین، به صورت وابسته به دوز مصرفی می تواند در بهبود کیست های تخمدانی و اختلالات هورمونی موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک مؤثر باشند. از این رو می توان آنها را به عنوان فرآورده های طبیعی مؤثر در کاهش بخشی از علائم تخمدان پلی کیستیک و القا کننده تخمک گذاری معرفی نمود.

تقدیر و تشکر

نویسنده مسؤول مقاله بر خود لازم می داند از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، کمال تشکر را به عمل آورد. همچنین بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه پیام نور قدردانی می شود. لازم به ذکر است تمام مراحل این پژوهش بر اساس دستور العمل و قوانین بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی طراحی و اجرا شده است و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی نیشابور با کد IR.NUMS.REC.1395.47 مورد تصویب قرار گرفته است.

و بهبود روند تخمک گذاری در موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک شود. همچنین عصاره چای سبز و کاتچین احتمالاً با تنظیم ترشح گنادوتروپین ها یا اثر بر گیرنده های آنها توانسته است اثر سوء اختلالات هورمونی موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک را کاهش دهد.

در این مطالعه، عدم امکان بررسی تأثیرات عصاره چای سبز و کاتچین بر سایر جنبه های سندرم تخمدان پلی کیستیک و عدم انجام مطالعات تکمیلی مانند شاخص های التهابی و شاخص های استرس اکسیداتیو بافت تخمدان، از جمله محدودیت های مطالعه بود. یکی از نکات مهم در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی کیستیک، ایجاد مقاومت به انسولین و افزایش وزن بدن است. عدم بررسی دوره ای وزن بدن و عدم سنجش سطح سرمی قند خون و هورمون انسولین و نیز عدم بررسی میزان مقاومت به انسولین، از سایر محدودیت های این مطالعه بود. پیشنهاد می شود مطالعات تکمیلی پیرامون شناخت دقیق مکانیسم اثر این ترکیبات در کنترل اختلالات بافتی و هورمونی ناشی از سندرم تخمدان پلی کیستیک انجام شود.

نتیجه گیری

اثر کاتچین در مقایسه با چای سبز بر بهبود پارامترهای هورمونی و افزایش تعداد فولیکول های تخمدانی در موش های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی کیستیک مطلوب تر است. گروه

منابع:

- 1- Ben-Shlomo I, Younis JS. Basic research in PCOS: are we reaching new frontiers? *Reprod Biomed Online*. 2014; 28(6): 669-83.
- 2- Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015; 145: 213-25.
- 3- Petr?kov? J1, Laz?rov? I. Ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Autoimmun Rev*. 2012; 11(6-7): A471-8.
- 4- Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, et al. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod*. 2001; 64(1): 157-62.
- 5- Casper RF. Letrozole versus clomiphene citrate: which is better for ovulation induction? *Fertil Steril*. 2009; 92(3): 858-9.

- 6- Dikmen A, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Dilsiz OY, Ercan G, Yilmaz H. Evaluation of glycemic and oxidative/antioxidative status in the estradiol valerate-induced PCOS model of rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 160(1): 55-9.
- 7- Choi SJ, Park SY, Park JS, Park SK, Jung MY. Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chem.* 2016; 204: 94-101.
- 8- Asadi S, Zamiri A, Ezzati S, Parsaei P, Rafieian M, Shirzad H. Effect of alcoholic extract of green tea (*Camellia sinensis*) on the healing process in surgical and burn wounds in rats. *J Birjand Univ Med Sci.* 2011; 18(1): 1-9. [Persian]
- 9- Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - A review. *Phytochemistry.* 2009; 70(1): 11-24.
- 10- Banitalebi E, Razavi T, Norian M, Bagheri L. The effect of combined aerobic exercise training and green tea extract on serum TNF- α and IL-6 levels in obese women with type 2 diabetes. *Daneshvar Med.* 2016; 23(123): 11-20. [Persian]
- 11- Shariatzadeh SMA, Mohammadi M. Protective role of green tea (*Camellia sinensis*) hydroalcoholic extract on sperm parameters and testicular tissue in NMRI mice exposed to sodium arsenite. *J Birjand Univ Med Sci.* 2015; 21(4): 432-43. [Persian]
- 12- Sadat Khorsandi L, Javadnia F, Ourazizadeh M, Abd Elahi M. Effect of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract on acetaminophen induced acute hepatotoxicity in mice. *Iran J Med Aromatic Plants.* 2010; 26(1): 22-9. [Persian]
- 13- Spadiene A, Savickiene N, Ivanauskas L, Jakstas V, Skesters A, Silova A, et al. Antioxidant effects of *Camellia sinensis* L. extract in patients with type 2 diabetes. *J Food Drug Anal.* 2014; 22(4): 505-11.
- 14- Morshedi M, Khaleghi M, Azarmi M, Mohammadzadeh A, Gol A. The Effect of Green Tea on Serum Concentrations of Estrogen, Progesterone and Gonadotropins in Female Rats. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2016; 24(102): 69-78. [Persian]
- 15- Sepehri-Moghadam H, Rahbarian R, Sadoughi SD. The effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* (Boiss.) O. Kuntze on the serum level of insulin and blood glucose and histomorphological changes of pancreas in diabetic rats. *Feyz.* 2015; 19(1): 30-7. [Persian]
- 16- Bekyürek T, Liman N, Bayram G. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Lab Anim.* 2002; 36(1): 51-60.
- 17- Pahlevani P, Mosavi S, Rastgoo Haghi A, Lahotian H, Esna Ashari F, Alizadeh Z. Study of the Effects of *Stachys Lvandulifolia* Alcoholic Extract on Histomorphometry of Endometrium in Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model. *J Hamadan Univ Med Sci.* 2016; 23(1): 40-8. [Persian]
- 18- Nabiuni M, Panahandeh SR, Doostikhah S, Karimzadeh Bardei L. The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Raspberry Fruit on Ovarian follicles and serum parameters in Poly Cystic Ovary Syndrome-Induced Rat. *Armaghane-danesh.* 2015; 19(11): 955-68. [Persian]
- 19- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 272(1-2): 22-37.
- 20- Nabiuni M, Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh L. The effect of curcumin on the estradiol valerate-induced polycystic ovary in rats. *Feyz.* 2015; 18(6): 515-23. [Persian]
- 21- Alizadeh F, Azarnia M, Mirabolghasemi G, Karampoor P. Effect of Fruit *Heracleum Persicum* Extract on Changes in Serum Levels of Sex Hormones in Rats with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Armaghane-danesh.* 2015; 20(1): 31-42. [Persian]
- 22- Satoha K, Sakamotoa Y, Ogataa A, Nagaia F, Mikuriyab H, Numazawac M, et al. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40(7): 925-33.
- 23- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology.* 2000; 141(3): 980-7.

- 24- Namal Senanayake SPJ. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications - A review. J Funct Foods. 2013; 5(4): 1529-41.
- 25- Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechi3-gallate: Inflammation and arthritis. Life Sci. 2010; 86(25-26): 907-18.