

Combined Effects of Carvacrol and EPCs on Antioxidant and Apoptotic Indices in a Polycystic Ovary Syndrome Animal Model

Fatemeh Zahra Shakeri¹ , Roya Bisheh Kolaei² , Omeh Leyla Bakhshi³ 

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qaem Shahr Branch, Islamic Azad University, Qaem Shahr, Iran. E-mail: fatemehshakeri@gmail.com

2. Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qaem Shahr Branch, Islamic Azad University, Qaem Shahr, Iran. E-mail: roya.bishehkolaei@iau.ac.ir, rbishe@gmail.com

3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qaem Shahr Branch, Islamic Azad University, Qaem Shahr, Iran. E-mail: leyla.bakhshi2014@gmail.com

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received 23 February 2026
Received in revised form 17
June 2026
Accepted 29 August 2026
Available online 22 September
2026

Keywords:

Carvacrol,
Endothelial Progenitor Cells,
Estradiol Valerate,
Polycystic Ovary Syndrome,
Western Blotting

ABSTRACT

Objective: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common hormonal disorder in women of reproductive age. This study investigated the effects of carvacrol and endothelial progenitor cells (EPCs) on antioxidant and apoptotic markers, including MDA, SOD, catalase, and Caspase-3, in a mouse model of PCOS.

Methods: PCOS was induced in mice by estradiol valerate injection. Treatments included a single tail-vein injection of bone marrow-derived EPCs, daily oral gavage of carvacrol for one month, or their combination. One month after the interventions, serum antioxidant markers (MDA, SOD, and catalase) and ovarian Caspase-3 expression were assessed by ELISA and Western blotting, respectively.

Results: ELISA results showed that catalase and SOD levels were significantly reduced in the PCOS group compared with controls ($p < 0.001$), whereas they increased after treatment with carvacrol and EPCs ($p < 0.05$). In contrast, MDA levels were elevated in the PCOS group relative to controls ($p < 0.01$) and were significantly reduced following intervention ($p < 0.001$). Western blot analysis also showed that Caspase-3 expression was increased in the PCOS group compared with controls ($p < 0.01$) and decreased after carvacrol and EPC treatment ($p < 0.05$).

Conclusion: EPCs and carvacrol reduced apoptotic markers and improved antioxidant status in the PCOS mouse model. These findings suggest that, following further preclinical validation, this approach may have potential for inclusion in therapeutic protocols for PCOS.

Cite this article: Shakeri, F. Z., Bisheh Kolaei, R., & Bakhshi, O. L. (2026). Synergistic effects of carvacrol and EPCs on antioxidant and apoptotic indices in a polycystic ovary syndrome animal model. *Nova Biologica Reperta*, 13 (2), 1-17. <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132122.0>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132122.0>

Publisher: Kharazmi University.

Introduction

- Clinical Context: PCOS causes ovulatory dysfunction, hyperandrogenism, metabolic/psychological issues, and infertility; current treatments are mostly symptomatic.
- Pathophysiology: Involves oxidative stress, endothelial dysfunction, and ovarian follicular apoptosis.
- Therapeutic Targets:

Carvacrol: Phenolic monoterpene with antioxidant and anti-apoptotic properties.

BM-EPCs: Bone marrow-derived stem cells promoting vascular repair and perfusion.

- Objective & Outcomes: Evaluate individual and combined effects of carvacrol and BM-EPCs on antioxidant defenses (CAT, SOD, MDA) and apoptosis (Caspase-3) in PCOS mice.
- Hypothesis: Combined therapy provides superior ovarian protection compared to monotherapies.

Method

This experimental study included 20 female C57BL/6 mice randomly assigned to five groups: control, PCOS, PCOS+EPCs, PCOS+EPCs+carvacrol, and PCOS+carvacrol. PCOS was induced with estradiol valerate. BM-EPCs were isolated, cultured, and identified by CD133, Tie2, and VEGFR2 expression. EPC-treated mice received 1×10^6 cells intravenously, while carvacrol was administered orally at 25 mg/kg/day for one month. Serum CAT, SOD, and MDA levels were measured by ELISA, and ovarian caspase-3 expression was assessed by Western blot. Data were analyzed using one-way ANOVA ($p < 0.05$).

Results

PCOS induction and EPC characterization (CD133+, Tie2+, VEGFR2+) were successfully confirmed. The PCOS group exhibited pronounced oxidative stress (decreased catalase and SOD, elevated MDA) and enhanced ovarian apoptosis (elevated Caspase-3) compared to controls. All treatments improved these parameters: catalase was significantly restored in the combined and carvacrol-only groups, SOD and MDA showed partial normalization across all treated groups, and Caspase-3 expression was significantly reduced by all interventions. Overall, carvacrol monotherapy demonstrated the strongest antioxidant and anti-apoptotic effects, closely followed by the EPC-plus-carvacrol combination.

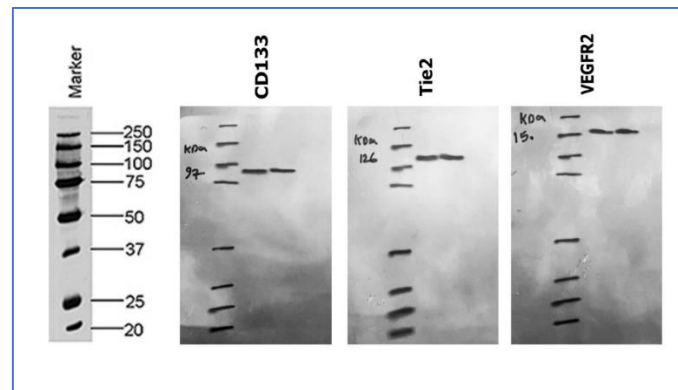


Figure 1. Western blot verification of EPCs showing CD133, Tie2, and VEGFR2 positivity.

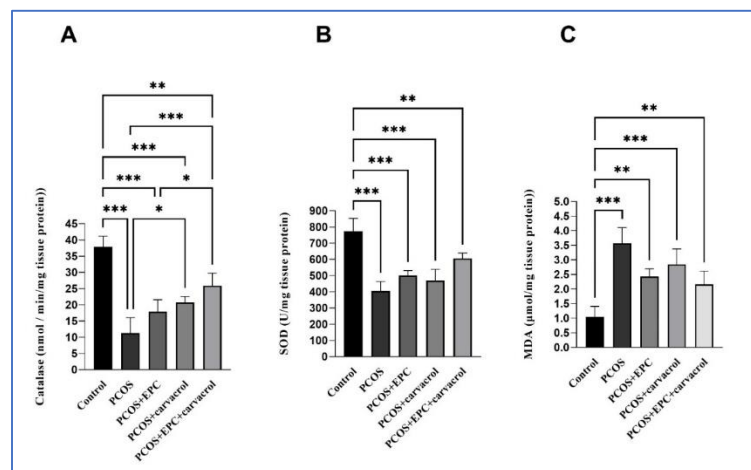


Figure 2. Antioxidant and oxidative stress markers in control and treated groups one month after treatment: (A) catalase, (B) SOD, and (C) MDA. Data were analyzed by one-way ANOVA (n=4).

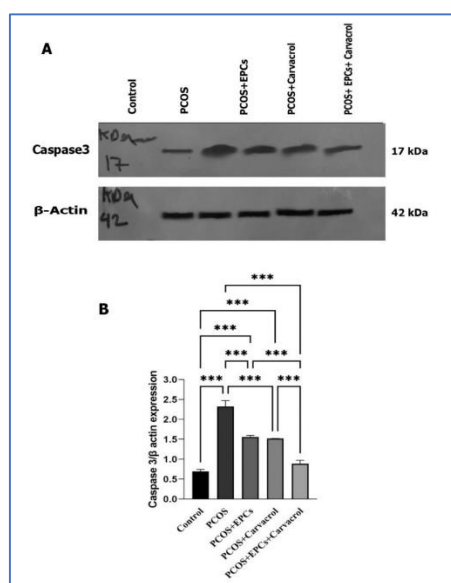


Figure 3. Western blot analysis of ovarian Caspase-3 protein expression across experimental groups normalized to β-actin.

Conclusions

This study demonstrated that estradiol valerate-induced PCOS impairs antioxidant defenses (decreased CAT and SOD, increased MDA) and enhances ovarian apoptosis (elevated caspase-3). Monotherapy with EPCs or carvacrol, as well as their combination, mitigated these pathological changes—carvacrol notably restored catalase activity and markedly suppressed caspase-3, while EPCs contributed to reducing oxidative stress and apoptotic signaling. Although both agents showed therapeutic potential, marker normalization was incomplete. Given the small sample size and inherent limitations of this animal model, future studies should evaluate alternative PCOS models, explore underlying signaling pathways (e.g., PI3K), assess metabolic and reproductive hormones (e.g., testosterone, LH, FSH, AMH), and investigate fertility outcomes prior to clinical translation.

Author Contributions

Author Contributions: F.Z. Shakeri collected the data and contributed to drafting the manuscript and data analysis. R. Bisheh kolaei contributed to drafting the manuscript, data analysis, and supervision. O.L. Bakhshi participated in data analysis. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the laboratories involved in animal care, cell culture, biochemical analyses, and Western blot experiments for their technical assistance.

Ethical Considerations

The study was approved by the Animal Ethics Committee of Islamic Azad University (Ethical code:)IR.IAU.SARI.REC.1404.099). All procedures involving animals were performed in accordance with relevant institutional guidelines and the National Institutes of Health idelines for the care and use of laboratory animals. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and other forms of research misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی اثرات درمان ترکیبی کارواکرول و سلول‌های EPCs بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوتیک در مدل حیوانی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک

فاطمه زهرا شاکری^۱، رویا بیشه کلایی^۲، امه لیلا بخشی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران. رایانامه: fatemehshakeri@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران. رایانامه:

rbysh@gmail.com roya.bishehkolaei@iau.ac.ir

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران رایانامه: leyla.bakhshi2014@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) از اختلالات شایع هورمونی در زنان سن باروری است. در این مطالعه، اثر کارواکرول و سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال (EPCs) بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوتیکی شامل MDA، SOD، کاتالاز و Caspase-3 در مدل موشی PCOS بررسی شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۴	روش‌ها: مدل PCOS با تزریق استرادیول والرات در موش‌ها القا شد. درمان شامل تزریق یک‌باره سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال (EPCs) مغز استخوان (ورید دمی)، گاواژ روزانه کارواکرول به مدت یک ماه، یا ترکیب هر دو بود. یک ماه پس از اتمام مداخلات، مارکرهای آنتی‌اکسیدانی سرم (MDA)، SOD و Catalase و بیان پروتئین Caspase-3 بافت تخمدان (به روش وسترن بلات) سنجش شدند.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۴	یافته‌ها: نتایج الیزا نشان داد که سطح آنزیم‌های SOD و Catalase در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود ($p < 0.001$) که پس از مداخله با کارواکرول و سلول‌های EPCs افزایش یافت ($p < 0.05$). نتایج مربوط به MDA برعکس دو آنزیم قبلی بود؛ به‌طوری‌که در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($p < 0.01$) و پس از مداخله کاهش یافت ($p < 0.001$). همچنین، نتایج وسترن بلاتینگ نشان داد که میزان پروتئین Caspase3 در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود ($p < 0.01$) و پس از مداخلات کارواکرول و سلول‌های EPCs کاهش یافت ($p < 0.05$).
کلیدواژه‌ها: استرادیول والرات، سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال سندرم پلی کیستیک تخمدان، کارواکرول، وسترن بلاتینگ	نتیجه‌گیری: سلول‌های EPCs و کارواکرول موجب کاهش فاکتورهای آپوپتوتیکی و تعدیل فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی در موش‌های مدل PCOS می‌شوند. بنابراین پیشنهاد می‌شود این درمان پس از طی مراحل پیش‌بالینی، وارد پروتکل‌های درمانی برای بیماران مبتلا به PCOS شود.

استناد: شاکری، فاطمه زهرا؛ بیشه کلایی، رویا؛ و بخشی، امه لیلا (۱۴۰۵). ارزیابی اثرات درمان ترکیبی کارواکرول و سلول‌های EPCs بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوتیک در مدل حیوانی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک. *یافته‌های نوین در علوم زیستی*، ۱۳ (۲)، ۱۷-۱.

<https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132122.0>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه خوارزمی.

مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز در زنان است و حدود ۱۵ تا ۱۸ درصد از زنان در سنین باروری را تحت تاثیر قرار می دهد (۱). این سندرم طیف گسترده ای از اختلالات ناهمگون، چند علیتی بوده و از نظر ژنتیکی بسیار پیچیده است که معمولاً با چندین بیماری از جمله عدم تعادل هورمونی، چاقی، هایپراینسولینمی و مقاومت به انسولین همراه می باشد. همچنین یکی از شایع ترین علت نازایی می باشد و به دنبال نقص در عملکرد تخمدان و عدم تخمک گذاری ایجاد می شود. علاوه بر این زنان مبتلا به PCOS در معرض ابتلا به بیماری های قلبی عروقی، تداخلات هورمونی، افسردگی و اختلالات اضطرابی می باشند. تظاهرات بالینی PCOS نیز متنوع است که بیشتر بصورت اختلالات قاعدگی مثل الیگو منوره یا آمنوره، افزایش هورمون های مردانه، هیپر آندروژنیسم / هیپر آندروژنمی، هیرسوتیسم و آکنه مشاهده می شوند. علی‌رغم تحقیقات گسترده و پیشرفت‌های قابل توجه در حوزه درمان سندرم تخمدان پلی کیستیک، هنوز راهکار درمانی قطعی و مؤثری برای رفع کامل این اختلال ارائه نشده (۲). درمان های رایج شامل تغییر سبک زندگی، کاهش وزن، استفاده از داروهای ضد بارداری خوراکی، کلومیفن سیترا، متفورمین، گنادوتروپین، لاپاراسکوپی و IVF^۱ است (۳، ۴). علاوه بر داروهای متداول، توسعه درمان های جایگزین با بهره گیری از گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها، نظیر کارواکرول، به دلیل هزینه کمتر، اثربخشی مطلوب و عوارض جانبی محدود، مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است (۵). علاوه بر اینها، درمان های مبتنی بر سلول و محصولات سلولی در مطالعات حیوانی در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته اند (۶، ۷).

گیاهان قدیمی ترین نوع دارو هستند و اثرات درمانی و کاربردهای آنها به خوبی شناخته شده است. کارواکرول یک مولکول مونو ترپنوئیدی است که ساختار آن به صورت ۵- ایزوپروپیل -۲- متیل فنول، با فورمول شیمیایی C₁₀H₁₄O است که در روغن های گونه های گیاهی معطر مانند تیموس، اوریگانوم، فلفل و سیاهدانه یافت می شود. کارواکرول دارای فعالیت های بیولوژیکی از جمله اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می باشد (۸). اثرات درمانی کارواکرول مانند خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن در بیماران مبتلا به اختلالات ریوی گزارش شده است (۹). در مطالعه ای رحیمی و همکارانش گزارش کردند که کارواکرول باعث کاهش تعداد و اندازه کیست های تخمدان در مدل های حیوانی PCOS شده است. این اثر ممکن است به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی کارواکرول باشد (۱۰). همچنین در مطالعه ای، با استفاده از کارواکرول در زنان مبتلا به PCOS گزارش دادند که کارواکرول باعث بهبود قابل توجهی در نظم قاعدگی، سطح هورمون های جنسی و شاخص های مقاومت به انسولین شد (۵). با توجه به روند رو به رشد ناباروری در سطح جهانی و نقش اثبات شده ترکیبات زیستی و دارویی گیاهان دارویی (از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد سرطانی و ضد التهابی آن‌ها) بر عملکرد سیستم تولیدمثل زنان، این مطالعه با هدف بررسی اثرات درمانی کارواکرول و سلول های پیش ساز اندوتلیالی (EPCs) در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) طراحی و اجرا شده است.

در سال های اخیر درمان های مبتنی بر سلول، به عنوان گزینه های مناسب برای درمان ناباروری مورد توجه قرار گرفته اند. سلول های EPCs سلول های نادری هستند که در خون گردش می کنند و در بافت چربی وجود دارند و سلول هایی را تشکیل می دهند که پوشش داخلی رگ های خونی را می سازند. همچنین EPCs ها سلول های پیش سازی هستند که توانایی ترمیم اندوتلیال را در رگ های خونی بالغ دارند و می توانند در ترمیم اندوتلیوم آسیب دیده، نقش مهمی داشته باشند. اختلال در سلول های EPCs باعث آسیب به رگ های خونی و کاهش خون رسانی به تخمدان ها می شود. این موضوع رشد فولیکول ها را مختل کرده، باعث افزایش التهاب، مقاومت به انسولین و اختلالات هورمونی می شود که همگی از عوامل اصلی ایجاد سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) هستند (۱۱). بدین منظور در مطالعه حاضر، از سلول های EPCs و کارواکرول جهت درمان بیماری PCOS استفاده شده است.

آنزیم های آنتی اکسیدانی خاصی در بدن تولید می شود. شناخته شده ترین این آنتی اکسیدان های طبیعی عبارتند از: سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلووتاتیون (GSH). این ترکیبات ساختار اکسیدان ها را تغییر می دهد و

¹ In vitro fertilization

آنها را به پراکسید هیدروژن تجزیه می‌کند (۱۲). تعدادی از آنزیمها نقش آنتی اکسیدانی مهمی را در برابر حمله ی گونه های فعال اکسیژن ایفا میکنند. از مهمترین این آنزیمها میتوان به کاتالاز اشاره کرد. خانی و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که سطوح سرمی هورمون لوتئینیزه کننده، تستوسترون، گلوکز، مقاومت به انسولین، مالون دی آلدئید، انسولین و استروژن افزایش یافت در حالی که سطح پروژسترون /آنزیم های آنتی اکسیدان در گروه PCOS به طور معنی داری از نظر آماری کاهش یافت (۱۳).

فاکتورهای اپوپتوتیکی مانند کاسپازها گروهی از آنزیم های پروتئازی می باشند که نقش مهم و کلیدی در وقوع پاسخ های التهابی، تمایز و مرگ برنامه ریزی شده سلولی دارند. این آنزیم ها نقش اساسی در شروع فرآیند آبشاری آپپتوز و القای آن به سلول ها را دارند. نقص عملکرد آنها می تواند باعث بروز بیماری هایی همچون سرطان شود. کاسپاز-۳، یک پروتئاز سیستئین-اسپارسیک اسید، اخیراً به دلیل نقش باورنکردنی آن در تمایز بافت، بازسازی و رشد عصبی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این آنزیم یک زیموژن کلیدی در آپپتوز سلولی است و تا زمانی که توسط کاسپازهای آغازگر در طول شار آپپتوز جدا نشود، فعال نمی شود. علاوه بر این، کاسپاز-۳ به عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرآیند آپپتوز، نقش حیاتی در تراکم کروماتین، قطعه‌قطعه شدن DNA، و ایجاد واکوئل در غشاهای پلاسمایی و هسته‌ای ایفا می‌کند (۱۴) تعداد زیادی از مطالعات نشان می‌دهد که PCOS با آپپتوز سلولی مرتبط است (۱۵، ۱۶). در مطالعه ای صالحی و همکارانش گزارش کردند افزایش بیان کاسپاز-۳ در بیماران مبتلا به PCOS می‌تواند منجر به افزایش آپپتوز در سلول‌های گرانولوزا تخمدان شود. این سلول‌ها نقش مهمی در رشد فولیکول‌ها، تولید هورمون‌ها و حمایت از تخمک‌گذاری دارند. مرگ برنامه‌ریزی‌شده این سلول‌ها باعث اختلال در بلوغ فولیکول‌ها، کاهش کیفیت تخمک و در نهایت ناباروری می‌شود (۱۷).

با توجه به نقش حیاتی گیاهان دارویی به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، و همچنین اهمیت درمان‌های مبتنی بر سلول در بیماران مبتلا به PCOS، مطالعه حاضر به بررسی تغییرات شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و آپپتوتیکی شامل MDA (Malondialdehyde)، SOD، Caspase-3 و Catalase در مدل حیوانی PCOS تحت تیمار با کارواکرول و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (EPCs) پرداخته است.

مواد و روش‌ها

گروه بندی و تعداد موش ها

در این مطالعه از ۲۰ سر موش ۶-۷ هفته ماده نژاد C57/BL6 با وزن تقریبی ۷۰-۸۰ گرم استفاده شد. موش‌های آزمایشگاهی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. تمامی مراحل نگهداری و تیمار حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه ملی بهداشت ایالات متحده (NIH) و با تأییدیه کمیته اخلاق در پژوهش‌های حیوانی (IR.IAU.SARI.REC.1404.099) انجام گرفت. حیوانات در شرایط کنترل‌شده شامل دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد، و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. قبل از مطالعه جهت عادت کردن به شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته ریکواری شدند. پس از آن موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه زیر گروه‌بندی شدند: گروه ۱: کنترل؛ این گروه هیچ گونه دارویی یا سلول ای دریافت نکردند. گروه ۲: القای PCOS. گروه ۳: القای PCOS و تزریق ۱ میلیون سلول EPCs از طریق ورید دمی (فقط یکبار). گروه ۴: القای PCOS + تزریق ۱ میلیون سلول EPCs و ۲۵ میلی گرم کارواکرول خوراکی (Cat No: W224511, Sigma-Aldrich) به صورت گاواژ. گروه ۵: القای PCOS و روزانه ۲۵ میلی گرم کارواکرول خوراکی به صورت گاواژ.

القای مدل PCOS

در این مطالعه PCOS با روش القاء هورمونی با داروی استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان، تهران) استفاده شد. پس از تزریق استرادیول والرات، به منظور بررسی وضعیت چرخه تولیدمثلی، روزانه تست اسمیر واژینال انجام شد. این بررسی‌ها تا زمان مشاهده بی‌نظمی در چرخه استروس و تثبیت مرحله اسمیر شاخی پایدار (Persistent Vaginal Cornification - PVC) ادامه یافت. مشاهده اسمیر شاخی پایدار به عنوان شاخص اصلی القای موفق سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) در نظر گرفته شد. فرآیند القا طی ۵۰ روز کامل شد و در طول این مدت هیچ‌گونه تلفات یا عارضه جانبی در حیوانات مشاهده نشد.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی پیش ساز اندوتلیال مغز استخوان (BM-EPCs)

برای این منظور موش‌ها را پس از بیهوشی با استفاده از کلروفرم، با روش جابجای گردن یوتانایز کردیم. استخوان فمور جدا شده و با استفاده از سرنگ حاوی محیط کشت DMEM^۲ با گلوکز بالا (GIBCO-Invitrogen, USA)، مغز استخوان شستشو داده شد. سوسپانسیون حاصل بر روی فایکول-هایپک (Sigma-aldrich, USA) ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰g سانتریفیوژ Model 5702 R, Eppendorf گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (BMMNCs) از لایه شیری رنگ بین دو فاز جدا شده و پس از دو مرحله شستشو با PBS، برای کشت آماده شدند. برای آماده‌سازی سطح پلیت‌ها، ابتدا با فیبرونکتین (Cat No: 3043050, promocell; Germany) پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. سپس سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده و محیط کشت اندوتلیال M199 حاوی فاکتور رشد EGM-2 شامل EGF، IGF، bFGF، VEGF، هیدروکورتیزول، اسید آسکوربیک، آنتی‌بیوتیک‌ها و ۳٪ سرم جنین گاوی، در شرایط استاندارد انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبت نسبی و ۵٪ CO₂) کشت داده شدند. (۱۸).

تزریقات موش‌ها

۵۰ روز پس از القای PCOS، به گروه‌های سوم تا پنجم تزریقات انجام شد. بدین صورت که به گروه سوم و چهارم پس از شمارش سلولی، حدود یک میلیون سلول EPCs از طریق ورید دمی که فقط یکبار تزریق انجام شد. به گروه چهارم که سلول EPCs تزریق شده بود، روزانه ۲۵ میلی گرم کارواکرول خوراکی به مدت یک ماه از طریق گاوژ انجام شد. و در نهایت به گروه پنجم فقط کارواکرول خوراکی به صورت گاوژ بدون تزریق سلول انجام شد.

نمونه برداری پس از تزریقات

دقیقاً یک ماه پس از آخرین گاوژ کارواکرول، نمونه برداری انجام شد. به این صورت که موش‌ها ابتدا توسط تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند، سپس خونگیری از قلب آنها انجام گردید. پس از خونگیری و انتقال خون‌ها به لوله‌های آزمایش، توسط جابجایی مهره گردن از مرگ حیوانات اطمینان حاصل می‌گردید. در نهایت موش‌ها تشریح شدند و بافت تخمدان جهت بررسی و سترن بلاتینگ بلافاصله برداشته شده، پس از شستشو در محلول PBS به کرایوپریال‌ها منتقل و به داخل نیتروژن مایع نگهداری شدند. پس از اتمام نمونه برداری، بافت‌های موجود در کرایوپریال داخل نیتروژن مایع تا زمان انجام آزمایشات به یخچال منفی ۸۰ درجه منتقل شدند. نمونه خون جدا شده از موش‌ها جهت سنجش هورمون‌ها، ابتدا سانتریفیوژ شده (۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰g) و سپس سرم رویی جدا شده و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

^۱ Bone marrow endothelial progenitor cells

^۲Dulbecco's Modified Eagle Medium

اندازه‌گیری فعالیت فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی

به منظور بررسی فعالیت فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی، نمونه‌های سرم بدست آمده از موش‌ها برای آزمایشات هورمونی از آنزیم‌های کاتالاز (Catalase) (Navand Lab Kit)، مالون دی‌آلدهید (MDA) (طب پژوهان رازی (TPR)) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Navand Lab Kit) به روش الایزا، مطابق پروتکل کیت شرکت سازنده استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت فاکتور آپوپتوتیکی Caspase3

برای ارزیابی سطح بیان پروتئین Caspase3، بافت‌های تخمدان جمع‌آوری و با استفاده از بافر RIPA لیز شدند (Sigma، Cat No: R0278). سپس در مجموع ۲۰ میکروگرم پروتئین تحت SDS-PAGE قرار گرفت و به یک غشای ۰.۲ میکرومتری Immune-BlotTM پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) منتقل شد (Bio-Rad Laboratories, CA, USA, Cat No: 1620174). غشاها با ۵٪ BSA (USA، MO، Sigma Aldrich؛ Cat No: A-7888) پوشانده شدند و سپس با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه BMP15 (Cat No: ab108413)، و GDF9 (Abcam) (Cat No: ab93892) انکوبه شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق. پس از آن، غشاها سه بار با TBST شسته شدند و با آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوش بز (Cat No: Abcam؛ ab6721) IgG H&L (HRP) انکوبه شدند. برای تجسم باندها، غشاها سپس با افزایش نورتابی شیمیایی (ECL) افزایش یافته (PARS CO، Cat No: B111421، مشهد، ایران) به مدت ۱-۲ دقیقه انکوبه شدند. β -اکتین به عنوان یک کنترل داخلی برای عادی‌سازی بیان پروتئین استفاده شد. تجزیه و تحلیل تراکم سنجی نوارهای پروتئینی با استفاده از یک آنالایزر ژل (کپی رایت ۲۰۱۰ توسط ایستوان لازار) انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها

جهت دستیابی به نتایج پژوهش، داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 8 با تست آماری ANOVA یک طرفه آنالیز گردید. برای بررسی تغییرات زمانی اندازه‌گیری‌ها در هر یک از گروه‌ها از تحلیل واریانس با اندازه‌گیری تکراری (ANOVA with Repeated Measures) و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. میزان P کمتر از ۰.۰۵ (P<0.05) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج القا PCOS

القا PCOS به خوبی به پیش رفت. در طی تزریق موش‌ها مشکلی برایشان پیش نیامد و تلفاتی در این مورد مشاهده نشد. به منظور اطمینان از القای کامل این سندروم، پس از تزریق روزانه تست اسمیر واژینال تا تغییرات سیکل استروس و نامنظم شدن آن و رسیدن به مرحله اسمیر واژینال شاخی پایدار (PVC) به عنوان مهمترین علامت القای PCOS ادامه پیدا کرد. القای PCOS بعد از ۵۰ روز در موش‌ها ایجاد شد.

نتایج کشت سلول‌های EPCs

EPCs بعد از جمع‌آوری فمور موش‌ها و جداسازی سلول‌های بنیادی به روش گرادیان شیب غلظت، کشت داده شدند. کشت سلول‌های بنیادی تا چهار پاساژ پیش رفت بدین دلیل که سلول‌ها تمایز پیدا نکنند. این سلول‌ها پس از سه شبانه روز به کف فلاسک می‌چسبیدند. این سلول‌های EPCs قادر به تشکیل کلونی بوده‌اند و پس از یک الی دو بار پاساژ کشیده تر می‌شوند و ظاهری دوکی پیدا کردند. در ابتدا بعد از حدود ۱۰ روز ۷۰ الی ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند. با توجه به مشاهدات سرعت رشد سلول‌های EPCs هر هفته یک بار سلول‌ها پاساژ داده شدند.

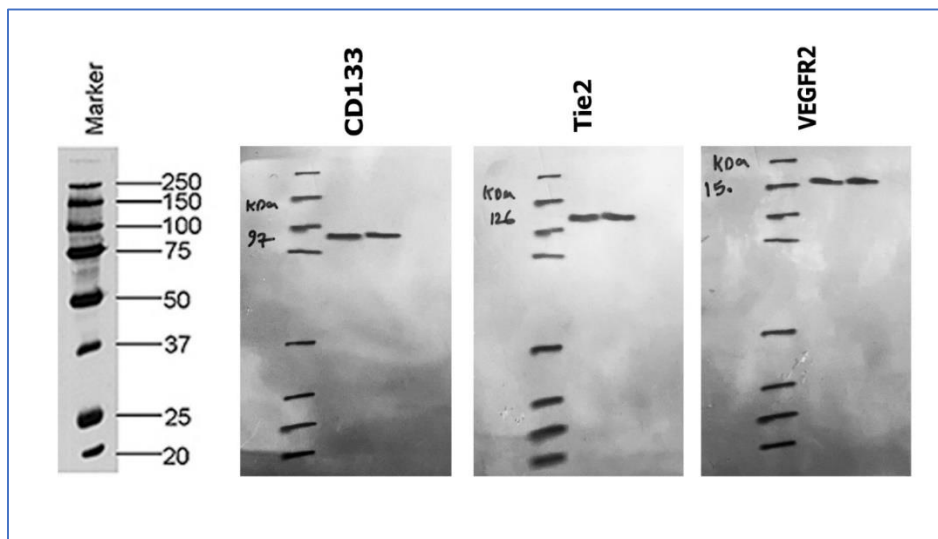
¹ Polyvinylidene fluoride

² Chemically enhanced vertebroplasty

³ Cornification Vaginal Persistent

نتایج تایید سلولهای EPCs

تایید سلولهای EPCs به چندین روش انجام می شود. در تحقیق حاضر ما از روش وسترن بلاتینگ برای تایید سلولهای EPCs استفاده کردیم. پروتئین های استفاده شده شامل: VEGFR2، Tie2 و CD133 می باشد که برای هر سه پروتئین با باندهای به ترتیب: ۱۵۰، ۱۲۶ و ۹۷ مثبت بوده است (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر، نتایج حاصل از آزمون وسترن بلات برای تایید EPCs را نشان می دهد. بیان سه مارکر اختصاصی شامل CD133، Tie2 و VEGFR2 مورد بررسی قرار گرفته است. وجود این سه مارکر در نمونه ها تأییدی بر ماهیت EPC بودن سلول های مورد استفاده در این تحقیق است.

Figure 1. The figure displays the results of the Western blot analysis used to verify the EPCs. The expression of three specific markers—CD133, Tie2, and VEGFR2—was investigated. The presence of these markers confirms the endothelial progenitor cell (EPC) phenotype of the cells utilized in this study.

نتایج بررسی میزان فاکتورهای آنتی اکسیدانی

بررسی میزان آنزیم کاتالاز

با توجه به نتایج بدست آمده در یک ماه پس از درمان با سلول EPCs و کارواکرول، نشان می دهد که در ابتدا آنزیم کاتالاز در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است که از نظر آماری معنادار است ($p < 0.001$). پس از درمان با سلول EPCs در این گروه نیز نسبت به گروه PCOS افزایش داشتیم که از نظر آماری معنادار نبود. همچنین در گروه درمان با EPCs و کارواکرول به صورت همزمان نسبت به گروه PCOS افزایش آنزیم کاتالاز را داشتیم ($p < 0.05$). در نهایت میزان آنزیم کاتالاز در گروه درمان با کارواکرول مشاهده شد که در مقایسه با گروه PCOS ما افزایش چشمگیری داشتیم که از نظر آماری معنادار بوده است ($p < 0.001$) و همچنین به گروه کنترل نزدیک تر است که نشان از موفقیت زیاد گروه کارواکرول نسبت به گروه های درمانی دیگر است بدین صورت که درمان با کارواکرول نسبت به گروه EPCs در آنزیم کاتالاز بهتر جواب داده است و نتایج آماری معنادار بوده است ($p < 0.05$) (شکل ۲a)

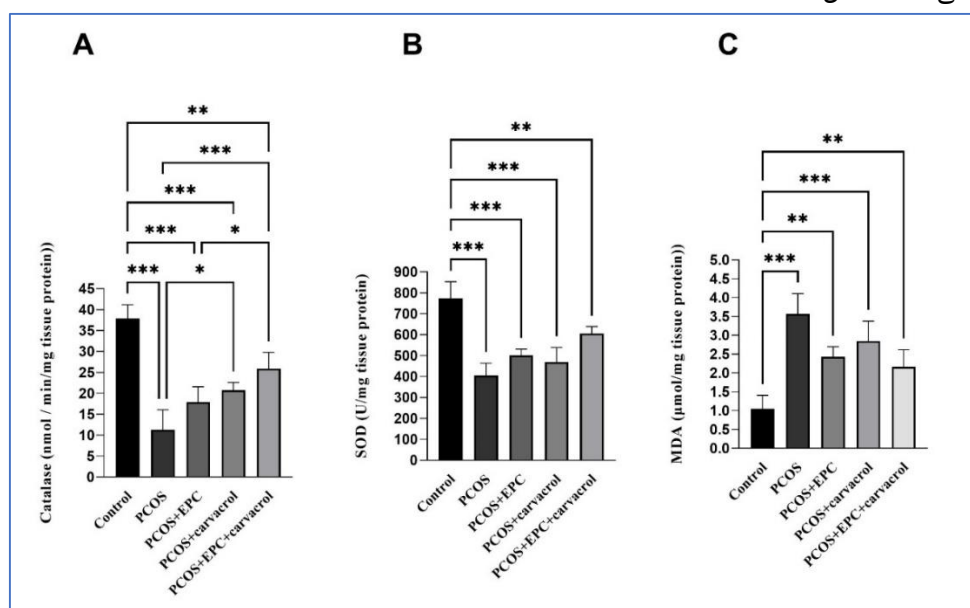
بررسی میزان SOD

نتایج آزمون ANOVA در ارزیابی میزان SOD نشان داد که در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری داشته است ($P < 0.001$). میزان SOD در گروه های درمان با EPCs، EPCs و کارواکرول و گروه کارواکرول روند افزایشی در مقایسه با PCOS مشاهده شد ولی از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. از طرف دیگر مقایسه گروه های درمانی نسبت به گروه کنترل نشان می دهد که درمان با EPCs و همینطور درمان با EPCs و کارواکرول در مقایسه با گروه کنترل کاهش

چشمگیری داشته است ($P<0.001$). همینطور کاهش در گروه درمان با کارواکرول نسبت به گروه کنترل از نظر آماری را نشان می‌دهد ($P<0.01$). می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در بین گروه‌های درمانی، میزان SOD در گروه کارواکرول نسبت به دو گروه درمانی دیگر میزان افزایش بیشتری نسبت به گروه PCOS داشته است که نشان از تعدیل میزان SOD بعد از درمان را نشان می‌دهد (شکل ۲b).

بررسی میزان MDA

در این مطالعه، القای مدل PCOS منجر به افزایش معنی‌دار سطح MDA نسبت به گروه کنترل شد ($P<0.001$) که نشان‌دهنده افزایش بار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از بیماری است. پس از اعمال مداخله‌های درمانی، مقایسه با گروه PCOS نشان داد که سطح MDA در گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های EPCs، کارواکرول، و به‌ویژه در گروه درمان ترکیبی (EPCs + Carvacrol) روند کاهشی را تجربه کرده است. از سوی دیگر، مقایسه گروه‌های تحت درمان با گروه کنترل سالم نشان داد که اگرچه درمان‌های انجام‌شده شدت پراکسیداسیون لیپیدی را تعدیل کرده‌اند، اما سطح MDA در گروه‌های درمانی همچنان به‌طور معنی‌داری بالاتر از سطح گروه کنترل باقی مانده است ($P<0.01$). این نتایج حاکی از آن است که درمان‌های منفرد و ترکیبی قادر به بهبود نسبی وضعیت استرس اکسیداتیو در بافت شده‌اند، اگرچه برای بازگشت کامل به سطوح پایه گروه کنترل نیاز به بهینه‌سازی دوز یا مدت زمان درمان خواهد بود (شکل ۲c). همچنین، تیمار همزمان با کارواکرول و EPCs منجر به افزایش قابل‌توجه شاخص‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل شد، به‌طوری‌که این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($P<0.001$). نتایج به صورت کلی نشان از تاثیر درمانی بهتر کارواکرول و سلول EPCs در میزان MDA نسبت به گروه PCOS دارد و همینطور این گروه درمانی تعدیل بهتر و نزدیکی با گروه کنترل دارد و آمارها نشان از معنادار بودن این نتایج را نشان می‌دهد (شکل ۲c).



شکل ۲- میزان بیان فاکتور آنتی‌اکسیدانی با آنالیز نرم افزار GraphPad Prism 8 با تست آماری ANOVA یک طرفه. (A)، میزان بیان کاتالاز؛ (B) میزان بیان SOD و (C) میزان بیان MDA. یک ماه پس از درمان در گروه‌های تیمار و کنترل. $***p<0.001$ و $**p<0.01$ ، $*p<0.05$. (n=4)

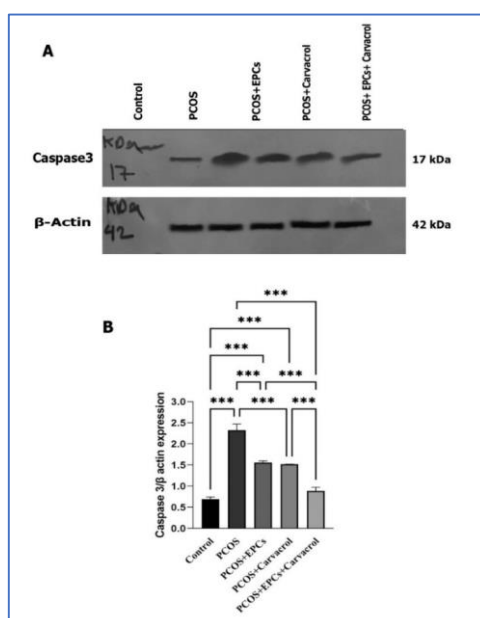
Figure 2. Levels of antioxidant and oxidative stress markers in the control and treated groups one-month post-treatment. (A) Catalase levels, (B) SOD levels, and © MDA levels. Data were analyzed using one-way ANOVA with GraphPad Prism 8 software (n=4). Significance levels are denoted as $*p<0.05$, $**p<0.01$, and $*p<0.001$.

بررسی میزان بیان پروتئین فاکتور آپوپتوتیک (کاسپاز-۳)

به منظور ارزیابی تغییرات مسیر آپوپتوز، سطح بیان پروتئین کاسپاز-۳ فعال در بافت تخمدان گروه‌های مختلف با روش وسترن بلاتینگ مورد سنجش قرار گرفت. در این بررسی از پروتئین بتا-اکتین (β -actin) به عنوان کنترل بارگذاری (Loading control / Housekeeping protein) جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (شکل ۳A). نتایج به صورت حرکت پروتئین کاسپاز-۳ در طول ژل پلی آکرلامید بر اساس وزن های مولکولی (۲۰، ۲۵، ۳۷، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ kDa) همراه با پروتئین کنترل بارگذاری برای بتا-اکتین ظاهر شدند (شکل ۳A).

بررسی میزان بیان فاکتور آپوپتوتیک (کاسپاز-۳)

نتایج حاصل از آنالیز آماری و دانسیتومتري وسترن بلات نشان داد که میزان بیان فرم فعال پروتئین کاسپاز-۳ (۱۷ و ۲۰ kDa) در بافت تخمدان گروه مدل نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیری افزایش یافته است (۰.۰۰۱ $\leq$ P < ۰.۰۰۱). این امر بیانگر فعال شدن مسیر اجرایی آپوپتوز و افزایش مرگ سلولی در تخمدان مبتلا به سندرم است. در مقابل، مداخلات درمانی منجر به کاهش معنی‌دار سطح بیان این پروتئین در مقایسه با گروه گردید (۰.۰۰۱ $\leq$ P < ۰.۰۰۱). نتایج نشان داد که درمان منفرد با سلول‌های و کارواکرول هر دو توانسته‌اند بیان این شاخص آپوپتوزی را به طور معنی‌داری کاهش دهند (۰.۰۰۱ $\leq$ P < ۰.۰۰۱). بیشترین اثر مهاری در گروه درمان ترکیبی (کارواکرول + سلول‌های) مشاهده شد، به گونه‌ای که سطح کاسپاز-۳ فعال را به وضعیت نزدیک به گروه کنترل سالم کاهش داد (۰.۰۰۱ $\leq$ P < ۰.۰۰۱). این نتایج حاکی از آن است که درمان همزمان کارواکرول و سلول‌های با مهار فعال‌سازی کاسپاز-۳، اثرات محافظتی مؤثری در کاهش آپوپتوز بافت تخمدان اعمال می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳- بررسی بیان پروتئین کاسپاز-۳. (الف) تصویر وسترن بلات کاسپاز-۳ و کنترل داخلی (بتا-اکتین). (ب) نمودار نتایج کمی (تراکم‌سنجی) بیان پروتئین کاسپاز-۳ در گروه‌های کنترل و تیمار، آنالیز شده با آزمون یک‌طرفه ANOVA. (* $p < 0.001$, $n = 4$). **Figure 3.** Western blot analysis of Caspase-3 protein expression. (A) Representative Western blot image of Caspase-3 and the loading control (beta-actin). (B) Quantification of Caspase-3 expression levels using densitometric analysis and one-way ANOVA in control and treated groups. (* $p < 0.001$, $n = 4$).

بحث

سندرم تخمدان پلی کیستیک یا نشانگان تخمدان پرکیستیک، اختلال مربوط به بیماری‌های غدد درون ریز (نارسایی اندوکراین و پاراکراین) در زنان با سنین باروری است. علاوه بر این زنان مبتلا به PCOS در معرض ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، تداخلات هورمونی، افسردگی و اختلالات اضطرابی می‌باشند. تظاهرات بالینی PCOS نیز متنوع است که بیشتر بصورت اختلالات قاعدگی مثل الیگو منوره یا آمنوره، افزایش هورمون‌های مردانه، هیپر آندروژنیسم / هیپر آندروژنمی، هیرسوتیسم و آکنه مشاهده می‌شوند. متأسفانه در حال حاضر درمان قطعی PCOS وجود ندارد با اینکه در کشورهای پیشرفته با توجه به الگوهای سبک تغذیه و زندگی‌های مدرن، این آمار در حال افزایش است.

مدل‌های حیوانی ابزار مهمی برای مطالعات این بیماری هستند بدین دلیل که PCOS سیستم‌های فیزیولوژیکی مختلفی را درگیر می‌کند. همچنین برای درک بهتر پاتوژنز PCOS و ارزیابی داروهای مختلف در جهت بهبود بخشیدن به درمان لازم و ضروری می‌باشد. در بیولوژی تولید مثل جهت القاء مدل PCOS، می‌توان به کمک روش‌های هورمونی و غیر هورمونی انجام داد که شامل هورمون تستوسترون، دهیدرواپی آندرستون، آدرنو-کورتیکوتروپین، استرادیول والرات و استفاده مداوم از استرس سرما و نور هستند. استرادیول والرات یکی از هورمون‌های جنسی اصلی در زنان است. این هورمون با تزریق زیر جلدی به بدن موش‌ها، با اتصال به گیرنده استروژنی در سیتوپلاسم، میزان ساخت DNA, RNA و پروتئین‌های مختلف را در بافت‌های هدف افزایش می‌دهد. همچنین میزان آزاد شدن GnRH از هیپوتالاموس تحت تاثیر استروژن کاهش می‌یابد و منجر به کاهش آزاد شدن FSH و LH از غده هیپوفیز می‌گردد. این مکانیسم با تاثیر بر مسیر هیپوتالاموس-هیپوفیز باعث افزایش هورمون‌های جنسی و در نتیجه PCOS می‌شود. در مطالعه حاضر ما متوجه شدیم که تزریق ۲ میلی گرم استرادیول والرات به صورت زیر جلدی و تک دوز باعث القاء PCOS در موش‌های ماده می‌شود که با مطالعات دیگر همخوانی دارد. محمد نبیونی و همکارانش در سال ۱۳۹۳ در مطالعه‌ای جهت بررسی تاثیر کورکومین بر تخمدان پلی کیستیک القا شده با استرادیول والرات در موش صحرایی، به میزان ۲ میلی گرم استرادیول والرات به صورت زیر پوستی و یکبار تزریق شد. همانند مطالعه ما، به منظور اطمینان از مدل PCOS، پس از تزریق، تست اسمیر واژینال گرفته شده بود تا تغییرات سیکل استروس و نامنظم شدن آن و رسیدن به مرحله اسمیر واژینال شاخی پایدار به عنوان مهمترین علامت القای مدل ادامه پیدا کند.

سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (EPCs) نقش اساسی در رگ‌زایی، ترمیم اندوتلیوم عروقی و بهبود خون‌رسانی به بافت تخمدان ایفا می‌کنند. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) با اختلال عملکردی و کاهش ظرفیت عروقی‌زایی همراه بوده و پیوند سلول‌های EPCs به همراه کارواکرول توانسته است اثرات محافظتی قابل توجهی بر بهبود بافت تخمدان اعمال کند. در تبیین این موضوع، Yu-Hsun Kao و همکارانش در سال ۲۰۲۲ گزارش کردند که زنان مبتلا به PCOS در معرض خطر بیشتری برای بیماری‌های قلبی-عروقی و اختلال عملکرد اندوتلیال قرار دارند (۱۹). همچنین PCOS با مقاومت به انسولین، هیپرانسولینمی و دیس‌لیپیدمی همراه است که می‌تواند منجر به کاهش تعداد و اختلال در عملکرد EPCs شود (۲۰)(۲۱). بر این اساس، تجویز کارواکرول و سلول‌های EPCs احتمالاً از طریق بهبود بقای سلولی و تعدیل ریزمحیط تخمدان، روند پاتولوژیک ناشی از PCOS را بهبود می‌بخشد.

MDA ترکیب واکنشی طبیعی است که به عنوان محصول جانبی پراکسیداسیون لیپیدی تشکیل شده است. اغلب به عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در سیستم‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود (۲۲). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت MDA به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو، در بیماران مبتلا به PCOS به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. این افزایش، که با نتایج مطالعات پیشین هم‌راستا است، احتمالاً ناشی از تولید بیش از حد ROS و آسیب اکسیداتیو در بافت‌ها می‌باشد. در مقابل، تیمار با سلول‌های EPCs و کارواکرول، چه به صورت منفرد و چه به صورت ترکیبی، منجر به کاهش قابل توجه سطح MDA شده و بهبود وضعیت اکسیداتیو در مدل PCOS را به همراه داشته است. این نتایج بیانگر نقش بالقوه درمانی EPCs و کارواکرول در تعدیل استرس اکسیداتیو و بهبود اختلالات مرتبط با PCOS می‌باشد (۲۳).

آنزیم کاتالاز به عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی، نقش کلیدی در خنثی‌سازی هیدروژن پراکسید و محافظت سلولی در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر، فعالیت کاتالاز در گروه مبتلا به PCOS به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است، که این یافته با نتایج مطالعات پیشین هم‌راستا می‌باشد (۲۴). کاهش فعالیت این آنزیم احتمالاً بیانگر اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بیماران PCOS است. با این حال، تیمار با سلول‌های EPCs و کارواکرول، چه به صورت منفرد و چه به صورت ترکیبی، منجر به افزایش فعالیت کاتالاز و نزدیک شدن آن به سطح گروه کنترل شده است. این نتایج نشان‌دهنده اثرات بالقوه درمانی EPCs و کارواکرول در بهبود وضعیت اکسیداتیو و ارتقاء عملکرد آنتی‌اکسیدانی در مدل PCOS می‌باشد.

SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تأثیر خنثی‌کننده ای در برابر آنیون سوپراکسید دارد. این مطالعه کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم SOD در بیماران PCOS در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. این نتیجه با یافته‌های پیشین مطابقت دارد که بیان کردند سطح سرمی SOD در بیماران PCOS به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل پایین تر است (۲۵). کاهش فعالیت SOD در این مطالعه ممکن است با افزایش استفاده از SOD برای حذف ROS تولید شده توسط هیپرگلیسمی و اسیدهای چرب آزاد اضافی مرتبط باشد. در مطالعه ما نیز هم‌راستا بوده و در گروه‌های درمان میزان آنزیم SOD افزایش یافته است که نتایج امیدوارکننده ای هستند. کاسپاز ۳ یک پروتئین پرو آپوپتوز است که نقش حیاتی در روند مرگ سلولی را ایفا می‌کند. بنابراین، برای جمع شدن کروماتین، تجزیه DNA، از دست دادن یکپارچگی غشای سلولی و تولید اجسام آپوپتوز ضروری است. سمیرا صحرائیان و همکارانش با بررسی سرعت لقاح و بلوغ تخمک در بیماران PCOS نشان دادند که سطح آپاپتوز سلولی و به خصوص کاسپاز ۳ در بیماران افزایش یافته و بعد از تیمار از میزان کاسپاز ۳ کاسته شده است (۲۶). هم‌راستا با این مطالعات، ما مشاهده کردیم که در گروه PCOS، کاسپاز ۳ افزایش یافته است. بعد از تیمار با سلول‌های EPCs و کارواکرول، سطح کاسپاز ۳ کاهش یافته است که نشان از کاهش آپاپتوز سلولی بوده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که تزریق EPCs در موش‌های مدل‌شده با PCOS منجر به بهبود نسبی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل گردیده است. همچنین، تجویز خوراکی کارواکرول به عنوان یک ترکیب گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی، تأثیرات مثبتی بر کاهش سطح فاکتورهای اکسیداتیو و تنظیم مسیرهای آپوپتوتیک نشان داده است. بررسی دقیق فاکتورهای بیوشیمیایی شامل کاتالاز، SOD، Caspase-3 و MDA در گروه‌های تحت تیمار با EPCs و کارواکرول، حاکی از آن است که این مداخلات درمانی توانسته‌اند به طور نسبی وضعیت اکسیداتیو و آپوپتوتیک را در مدل PCOS بهبود بخشند. با این حال، سطح برخی از این فاکتورها همچنان نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نشان می‌دهد که بیانگر نیاز به بهینه‌سازی بیشتر در نوع، دوز و مدت زمان درمان است.

پیشنهادهای

در مطالعه حاضر، اگرچه استفاده از استرادیول والرات یک روش شناخته‌شده است، اما این مدل تمامی ویژگی‌های کلینیکی PCOS (مانند مقاومت به انسولین و چاقی) را به طور کامل بازتولید نمی‌کند. پیشنهاد می‌شود استفاده از مدل‌های مکمل (مثل مدل القا شده توسط لئروزول) در مطالعات آینده مد نظر گرفته شود. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود جهت مشخص شدن اثر ژن و مکانیسم آن در PCOS، از بیان ژن‌های مسیر سیگنالی PI3K استفاده شود. بررسی پروتئین‌های دخیل در این مسیر سیگنالی می‌تواند در روشن شدن دقیق تر نقش آنها در درمان این بیماری کمک کننده باشد. همچنین گسترش مطالعات با تمرکز بر اندازه گیری سطوح هورمون‌های تستوسترون، LH، FSH، استرادیول و AMH جهت بررسی دقیق‌تر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان و ارزیابی اثربخشی درمان‌های جدید، پیشنهاد می‌شود و جهت نتیجه گیری بهتر درمان PCOS، جفت گیری طبیعی بعد از تیمارها انجام شده و تا سه نسل ادامه یابد.

امیدواریم نتایج بدست آمده از این پژوهش، چشم انداز مثبتی جهت ادامه مسیر برای دست یابی به روش های نوین درمان PCOS و ناباروری در زنان با سنین باروری بوده باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش کد اخلاق را به شماره IR.IAU.SARI.REC.1404.099 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری دریافت کرده است.

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

مشارکت نویسندگان

جمع‌آوری داده‌ها: فاطمه زهرا شاکری.

تهیه گزارش پژوهش: فاطمه زهرا شکوری و دکتر رویا بیشه کلایی.

تحلیل داده‌ها: فاطمه زهرا شکوری، امه لیلا بخشی و رویا بیشه کلایی.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

هیچ گونه تامین مالی از موسسه یا نهادی صورت نگرفته است.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Fitz V, Graca S, Mahalingaiah S, Liu J, Lai L, Butt A, et al. Inositol for Polycystic Ovary Syndrome: a systematic review and meta-analysis to inform the 2023 update of the International Evidence-Based PCOS Guidelines. 2024;109(6):1630-55. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad762>
- Tay CT, Mousa A, Vyas A, Pattuwage L, Tehrani FR, Teede HJ. 2023 International Evidence-Based Polycystic Ovary Syndrome Guideline Update: Insights From a Systematic Review and Meta-Analysis on Elevated Clinical Cardiovascular Disease in Polycystic Ovary Syndrome. 2024;13(16):e033572. <https://doi.org/10.1161/jaha.123.033572>
- Bai H, Ding H, Wang MJ, Obstetrics E, Gynecology. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Symptoms, Causes, and Treatment. 2024;51(5):126. <https://doi.org/10.5772/intechopen.113799>
- Jin Y-X, Hu H-Q, Zhang J-C, Xin X-Y, Zhu Y-T, Zhang H-L, et al. Research status of polycystic ovary syndrome treatment: a mini review and a bibliometric analysis from 2010 to 2023. 2024;40(1):2405098. <https://doi.org/10.1080/09513590.2024.2405098>
- Nazdikbin Yamchi N, Ahmadian S, Amjadi F, Bakhshi OL, Rahbarghazi R, Mahdipour MJRB. Carvacrol regulates the expression of genes involved in the Tgf- β /Smads signaling pathway in a rat model of POI. 2024;1(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01488-z>
- Khatun M, Lundin K, Naillat F, Loog L, Saarela U, Tuuri T, et al. Induced Pluripotent Stem Cells as a Possible Approach for Exploring the Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). 2024;20(1):67-87. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10627-w>

- Liu X, Li J, Wang W, Ren X, Hu J-FJLs. Therapeutic restoration of female reproductive and endocrine dysfunction using stem cells. 2023;322:121658. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121658>
- El Boukhari R, Fatimi AJRPoB. Carvacrol: Innovative synthesis pathways and overview of its patented applications. 2025;19(1):53-68. <https://doi.org/10.2174/0118722083292888240223094707>
- Eriten B, Kucukler S, Gur C, Ayna A, Diril H, Caglayan CJET. Protective Effects of Carvacrol on Mercuric Chloride-Induced Lung Toxicity Through Modulating Oxidative Stress, Apoptosis, Inflammation, and Autophagy. 2024. <https://doi.org/10.1002/tox.24397>
- Rahimi V, Hekmatimoghaddam S, Jebali A, Khalili Sadrabad E, Akrami Mohajeri FJJoN, Security F. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of Zataria Multiflora. 2019;4(1):1-6. <https://doi.org/10.18502/jnfs.v4i1.394>
- Divoux A, Erdos E, Whytock K, Osborne TF, Smith SRJC. Transcriptional and DNA methylation signatures of subcutaneous adipose tissue and adipose-derived stem cells in PCOS women. 2022;11(5):848. <https://doi.org/10.3390/cells11050848>
- Dutta S, Sengupta P, Izuka E, Menuba I, Nwagha U. Oxidative and nitrosative stress and female reproduction: Roles of oxidants and antioxidants. Journal of Integrated Science and Technology. 2024;12(3):754-. <https://doi.org/10.62110/sciencein.jist.2024.v12.754>
- Khani S, Abdollahi M, Khalaj A, Heidari H, Zohali SJIJoRB. The effect of hydroalcoholic extract of Nigella Sativa seed on dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats: An experimental study. 2021;19(3):271. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i3.8575>
- Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2022;69(4):1633-45. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
- Uyanikoglu H, Sabuncu T, Dursun H, Sezen H, Aksoy NJB. Circulating levels of apoptotic markers and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome: a case-controlled descriptive study. 2017;22(7):643-7. <https://doi.org/10.1080/1354750x.2016.1265004>
- Yang R, Chen J, Wang L, Deng AJMMR. LncRNA BANCER participates in polycystic ovary syndrome by promoting cell apoptosis. 2019;19(3):1581-6. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9793>
- Salehi E, Aflatoonian R, Moeini A, Yamini N, Asadi E, Khosravizadeh Z, et al. Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. 2017;296:1219-27. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4523-5>
- Elish SE, Sanad FA, Baky MH, Yasin NA, Temraz A, El-Tantawy WHJJoTEiM, et al. Ficus natalensis extract alleviates Cadmium chloride-induced testicular disruptions in albino rats. 2022;70:126924. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126924>

- Kao Y-H, Chiu W-C, Hsu M-I, Chen Y-JJIJoF, Sterility. Endothelial progenitor cell dysfunction in polycystic ovary syndrome: implications for the genesis of cardiovascular diseases. 2013;6(4):20 http://www.ijfs.ir/article_45148.html
- Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, Pan N-H, Lin Y-K, Chen Y-JJCs. Cardiac peroxisome-proliferator-activated receptor expression in hypertension co-existing with diabetes. 2011;121(7):305-12. <https://doi.org/10.1042/cs20100529>
- Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo R, Cascella T, Colao A, et al. Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. 2006;119(4):356. e1-. e6. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.10.059>
- Enechukwu CI, Onuegbu AJ, Olisekodiaka MJ, Eleje GU, Ikechebelu JI, Ugboaja JO, et al. Oxidative stress markers and lipid profiles of patients with polycystic ovary syndrome in a Nigerian tertiary hospital. 2019;62(5):335-43. <https://doi.org/10.5468/ogs.2019.62.5.335>
- Gökçek İ, Uyanık G, Tutar T, Gözer AJN-SsAoP. Effects of carvacrol on hormonal, inflammatory, antioxidant changes, and ovarian reserve in polycystic ovary syndrome in Wistar rats. 2025;398(4):4607-16. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03588-5>
- Siddiqua A, Malik A, Iqbal U, Sial NT, Mehmood MH, Rehman MFuJI. Antioxidative and anti-inflammatory effects of Carvacrol against polycystic ovary syndrome associated complications using high fat diet and Letrozole challenged rat model: a multidisciplinary study cascading in vivo, in vitro, in silico and network pharmacology approaches. 2025:1-22. <https://doi.org/10.1007/s10787-025-01809-8>
- Siddiqua A, Malik A, Niazi SG, Uttra AM, Mehmood MH, Munir M, et al. Cinnamaldehyde mitigates polycystic ovary syndrome pathologies by modulating NLRP3/NF-κB mediated inflammation using letrozole-induced model in female rats: a comprehensive in vitro, in vivo, in silico investigation. 2025:1-19. <https://doi.org/10.1007/s00210-025-04536-7>
- Sahraeian S, Abbaszadeh HA, Taheripanah R, Edalatmanesh MAJJoLiMS. Extracellular vesicle-derived cord blood plasma and photobiomodulation therapy down-regulated caspase 3, LC3 and Beclin 1 markers in the PCOS oocyte: An In Vitro Study. 2023;14:e23. <https://doi.org/10.34172/jlms.2023.23>