

Investigating the effect of trans-anethole on the expression changes of TNF- α , resistin, and chemerin genes in visceral adipose tissue caused by estradiol valerate injection in female wistar rats

Mahsa Dindar¹, Seyed Mahdi Banan Khojasteh^{*1}, Hatam Ahmadi², Homiera Hatami Nemati¹, Fariba Mahmoudi³

¹Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Department of Biology Education, University of Farhangian, Tehran, Iran

³Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 29 Jan 2024

Revised: 16 Apr 2024

Accepted: 20 Apr 2024

ePublished: 1 Feb 2025

Keywords:

- Adipokines
- Estradiol valerate
- Polycystic ovary syndrome
- Trans-anethole

Abstract

Background. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the endocrine diseases of the reproductive system, with a prevalence of 5–10% in women, and one of its symptoms is an increase in the serum amount of pro-inflammatory adipokines from adipose tissue.

Methods. This study was performed on six groups of 6 female rats, including a sham group, an estradiol valerate experimental group that received a concentration of 2 mg per kg of estradiol valerate, and two trans-anethole experimental groups that received concentrations of 50 mg/kg and 80 mg/kg of trans-anethole. The other groups were two experimental groups of estradiol valerate treated with trans-anethole that received concentrations of 50 mg/kg and 80 mg/kg of trans-anethole 60 days after receiving estradiol valerate. The data were statistically analyzed with a one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test via SPSS.

Results. Increased expression of *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), *chemerin*, and *resistin* genes in the visceral fat tissue of rats caused by the intramuscular injection of estradiol valerate was reduced by the intraperitoneal injection of concentrations of 50 mg/kg and 80 mg/kg of trans-anethole ($P < 0.05$).

Conclusion. Trans-anethole ameliorated the expression of TNF- α , *chemerin*, and *resistin* genes in the visceral fat tissue of female rats suffering from PCOS.

Practical Implications. The use of trans-anethole as an extract of anise and fennel may be effective in reducing the inflammatory complications of women with PCOS.

How to cite this article: Dindar M, Banan Khojasteh S M, Ahmadi H, Hatami Nemati H, Mahmoudi F. Investigating the effect of trans-anethole on the expression changes of TNF- α , resistin, and chemerin genes in visceral adipose tissue caused by estradiol valerate injection in female wistar rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(1):41-51. doi: 10.34172/mj.025.33564. Persian.

Extended Abstract

Background

Ovulation in women's ovaries is a semi-inflammatory condition, but uncontrolled inflammation can lead to polycystic ovary syndrome (PCOS). Ovaries with a volume of more than 10 mm and follicles with a diameter of 2–9 mm and many 12

or more are indicated to be polycystic, which is determined by ultrasound. There are various methods to treat laboratory animals with PCOS, including the administration of estradiol valerate, dehydroepiandrosterone, dihydrotestosterone, and testosterone propionate. Nonetheless, no definitive

*Corresponding author; Email: smbanan@tabrizu.ac.ir

© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

treatment has been provided for PCOS patients, and adverse effects have been reported in the use of common chemical drugs such as clomiphene citrate, metformin, letrozole, and spironolactone in the treatment of PCOS. The use of medicinal plants that slow down the progression of the disease and have minimal side effects is a priority. Although several studies have shown the role of fennel plant extract in many women's diseases, no study has so far reported the therapeutic properties of trans-anethole in mice with PCOS. Accordingly, this study investigated the effect of the intraperitoneal injection of trans-anethole on the expression of inflammatory adipokine genes such as *TNF- α* , *resistin*, and *chemerin* in the visceral fat tissue of female Wistar rats with PCOS.

Methods

Overall, 36 female Wistar rats, obtained from the Medicine Faculty of the Medical University of Tabriz, weighing 180–220 g, were used in this experimental study. The ethical standards of working with laboratory animals were taken into consideration when working with rats. To conduct this study, the necessary permission was obtained from the Ethics Committee of the University of Tabriz (ethical code IR.TABRIZU.REC.1399.037). The method used in this study to induce PCOS in female rats was hormonal induction by the intramuscular injection of estradiol valerate. Female rats with a weight range of 180–200 g were randomly divided into six groups of 6. The control group received 0.5 mL of saline intraperitoneally. Two experimental groups of trans-anethole received concentrations of 50 mg/kg and 80 mg/kg trans-anthol intraperitoneally. The PCOS experimental group received 2 mg/kg of estradiol valerate dissolved in sesame oil as an intraperitoneal, and two experimental groups of PCOS treated with trans-anethole received concentrations of 50 mg/kg and 80 mg/kg of trans-anethole 60 days after being diagnosed with PCOS. To exterminate the rats, one day after the last injection of drugs, 0.2 mL of the combination of anesthetic ketamine and xylazine per 100 g of the rats' body weight was intraperitoneally injected using an insulin syringe. The expression level of *TNF- α* , *chemerin*, and *resistin* genes in the tested tissue samples was determined, and the quality and concentration of the extracted RNA were estimated

with a nanodrop device. After determining the concentration and purity of the extracted RNAs, cDNA was prepared using the Takara kit in a final volume of 20 μ L. A one-way analysis of variance test was used to compare the quantitative difference of the average data in the experimental groups. To compare the qualitative difference of the average data, Tukey's post hoc test was performed using SPSS-16 software, and $P < 0.05$ was considered a significant difference between the groups. Graphs were drawn using Excel 2016 software.

Results

The results of this research revealed that the intraperitoneal injection of the used concentrations of trans-anethole improved the expression of the *TNF- α* gene in rats poisoned with the intended concentration of estradiol valerate. The results further showed that the intraperitoneal injection of the intended concentrations of trans-anethole increased the expression of the *chemerin* gene in rats poisoned with the used concentration of estradiol valerate. The results of the study on the effect of drug interaction demonstrated that the intraperitoneal injection of the intended concentrations of trans-anethole improved the resistance gene expression of poisoned rats caused by the used concentration of estradiol valerate.

Conclusion

The use of trans-antol concentrations in this study decreased the expression level of genes related to inflammatory cytokines in visceral adipose tissue in rats with PSOC. It can be concluded that the administration of trans-anethole to women suffering from PSOC may be effective in reducing the inflammatory complications related to this syndrome. However, the definitive conclusion of this claim requires more laboratory studies on laboratory animals and more clinical studies. It is suggested that in future studies, the effect of the intraperitoneal injection of trans-anethole on the serum concentration of *TNF- α* , *chemerin*, *resistin*, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol, and testosterone hormones, as well as the expression of ghrelin, neuropeptide Y, leptin, interleukin 6 (IL-6), and IL-1, be investigated in rats with PCOS.

بررسی اثر ترانس-آنتول بر تغییرات بیان ژن های $TNF-\alpha$ ، ریزستین و کیمیرین در بافت چربی احشایی ناشی از تزریق استرادیول والرات در موش های صحرایی ماده نژاد ویستار

مهسا دیندار^۱، سیدمهدی بانان خجسته^{۱*}، حاتم احمدی^۲، حمیرا حاتمی نعمتی^۱، فریبا محمودی^۳

^۱ گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ گروه آموزشی زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه. سندرم تخمدان پلی کیستیک از بیماری های محور اندوکرینی دستگاه تولیدمثل با شیوع ۱۰-۵ درصدی در زنان است که از علایم آن، افزایش مقدار سرمی آدیپوکین های پیش التهابی از بافت چربی است. **روش کار.** این مطالعه بر روی شش گروه ۶ تایی از موش های صحرایی ماده صورت گرفته است که شامل: گروه شاهد، یک گروه آزمایشی استرادیول والرات که غلظت ۲ میلی گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات دریافت کردند، دو گروه آزمایشی ترانس-آنتول که غلظت های ۵۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول دریافت کردند و دو گروه آزمایشی استرادیول والرات تحت درمان با ترانس-آنتول که ۶۰ روز بعد از دریافت استرادیول والرات، غلظت های ۵۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول را دریافت کردند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. **یافته ها.** افزایش بیان ژن های $TNF-\alpha$ ، کیمیرین و ریزستین در بافت چربی احشایی موش های صحرایی ناشی از تزریق عضلانی استرادیول والرات، با تزریق داخل صفاقی غلظت های ۵۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول کاهش یافت ($P < 0.05$). **نتیجه گیری.** ترانس-آنتول، موجب بهبودی میزان بیان ژن های $TNF-\alpha$ ، کیمیرین و ریزستین در بافت چربی احشایی موش های صحرایی ماده مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک شد. **پیامدهای عملی.** استفاده از ترانس-آنتول به عنوان عصاره گیاه انیسون و رازیانه، ممکن است در کاهش عوارض التهابی زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک مؤثر باشد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۹

اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۱/۲۸

پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱

انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳

کلیدواژه ها:

- آدیپوکین ها
- استرادیول والرات
- ترانس-آنتول
- سندرم تخمدان پلی کیستیک

مقدمه

آندروژن ها، افزایش آدیپوکین های پیش التهابی و مقاومت به انسولین است.^۱ اختلالات ترشح گنادوتروپین ها از علایم بارز این اختلال است که در آن، تخمدان ها ترشح آندروژن را افزایش می دهد و مقدار ترشح LH (Luteinizing hormone) نسبت به FSH (Follicle stimulating hormone) نیز افزایش می یابد.^۲ این سندرم با بسیاری از اختلالات نورواندوکرینی و متابولیکی مانند هیپرکلسترولنمیا، اختلال در متابولیسم لیپیدها و نیز بیماری های قلبی-عروقی، هیپرتانسیون و سرطان سینه و تخمدان رابطه مستقیم دارد.^۳ دیابت نوع ۲ عامل خطر برای PCOS محسوب می شود، به طوری که چاقی و مقاومت به انسولین با آن رابطه مستقیم دارد.^۴ برای ابتلای حیوانات آزمایشگاهی با ویژگی های PCOS،

تخمک گذاری در تخمدان زنان وضعیتی نیمه التهابی است اما التهاب کنترل نشده می تواند منجر به بروز سندرم تخمدان پلی کیستیک یا PCOS (Polycystic Ovary Syndrome) شود. به تخمدان های با حجم بیش از ۱۰ میلی متر و محتوی فولیکول های دارای قطر ۹-۲ میلی متر و تعداد ۱۲ یا بیشتر از آن، پلی کیستیک گفته می شود که با سونوگرافی مشخص می شود.^۱ این سندرم از بیماری های محور اندوکرینی دستگاه تولیدمثل زنان با شیوع ۱۰-۵ درصدی است که اگرچه ممکن است در هر سنی ظاهر شود ولی در سنین قبل از یائسگی شیوع بیشتری دارد.^۲ PCOS دارای علایمی همچون کاهش و یا عدم تخمک گذاری، افزایش سطح سرمی

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: smbanan@tabrizu.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

هیپرگلیسمی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است.^{۱۶،۱۳} از اسانس رازیانه می‌توان در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد.^{۱۳} همچنین روغن رازیانه نیز در رفع احتقان ریوی، برونشیت و آسم مؤثر است.^{۱۳} تاکنون درمان قطعی برای بیماران PCOS ارائه نشده است و عوارض نامطلوبی در استفاده از داروهای شیمیایی رایج همچون کلومیفن سیترا، متفورمین، لتروزول و اسپرونولاکتون در درمان PCOS گزارش شده است.^{۱۷} لذا استفاده از گیاهان دارویی که روند پیشرفت بیماری را کند کرده و دارای عوارض جانبی حداقلی باشند، در اولویت است. اگرچه در مطالعات متعددی، نقش عصاره گیاه رازیانه در بسیاری از بیماری‌های زنان از جمله اختلالات قبل از قاعدگی PMS (Premenstrual syndrome)، خونریزی شدید قاعدگی، قاعدگی دردناک، یائسگی، آتروفی واژن و اختلال عملکرد جنسی در زنان یائسه گزارش شده است،^{۱۳} ولی تاکنون در مطالعه‌ای به خواص درمانی ترانس-آنتول در موش‌های مبتلا به PCOS اشاره نشده است.^{۱۸} در این مطالعه تأثیر تزریق داخل صفاقی ترانس-آنتول بر بیان ژن‌های آدیپوکین التهابی $TNF-\alpha$ ، رزیستین و کیمیرین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار مبتلا به PCOS ناشی از تزریق داخل عضلانی استرادیول والرات بررسی شد.

روش کار

در این مطالعه تجربی از ۳۶ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار، تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، در محدوده وزنی ۲۲۰ - ۱۸۰ گرم استفاده شد. به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، جانوران به مدت دو هفته در گروه‌های ۵ تایی در شرایط دمای ثابت محیطی ($22 \pm 2^\circ C$) و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری شدند. هنگام کار با موش‌های صحرایی، موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. جهت اجرای این پژوهش، مجوز لازم در قالب کد اخلاق IR.TABRIZU.REC.1399.037 از کمیته اخلاق دانشگاه تبریز گرفته شده است.

مواد مورد استفاده در این پژوهش عبارت بود از: محلول ترايزول (شرکت DNAbiotech ایران)، اتانول ۷۰-۷۵٪، ژل آگارز ۱٪ (یکتا تجهیز آزما- ایران)، سالین نرمال، الکل، پنبه، استرادیول والرات (شرکت Sigma Aldric)، ترکیب خالص ترانس-آنتول (شرکت Sigma Aldric)، مخلوط ماده بیهوشی کتامین و زایلازین (شرکت Sigma)، پرایمر سنس و آنتی‌سنس (ژن فناوری، ایران)، کلروفورم و ایزوپروپانول (شرکت Merck آلمان)، کیت سنتز cDNA (شرکت

روش‌های مختلفی از جمله تجویز: استرادیول والرات، دی هیدرواپی اندرستندین DHEA (Dehydroepiandrosterone)، دی‌هیدروتستوسترون DHT (Dihydrotestosterone) و تستوسترون پروپیانات TP (Testosterone propionate) وجود دارد،^۴ که در این تحقیق از تزریق داخل صفاقی استرادیول والرات برای ابتلا موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار به PCOS استفاده شد. آدیپوسیت‌های بافت چربی، سلول‌های ترشحی هستند که پروتئین‌های مختلفی را با اعمال هورمونی تولید می‌کنند که در مجموع به آن‌ها آدیپوسایتوکاین گفته می‌شود. این سایتوکاین‌ها با تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها، در فیزیولوژی تولیدمثل مردان و زنان نقش مهمی دارند.^۵ مطالعات نشان داده است که سطوح پلاسمایی آدیپوسایتوکاین‌هایی نظیر فاکتور نکروز توموری آلفا $TNF-\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha)، کیمیرین (Chemerin)، رزیستین (Resistin) و اینترلوکین ۶ IL-6 (Interleukin-6) در زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد.^۶ رزیستین و کیمیرین با ماهیت تنظیم‌کنندگی متابولیسم انرژی، جزو آدیپوکین‌ها یا سایتوکاین‌های التهابی جدید شناخته شده هستند که از بافت چربی ترشح می‌شوند و بیان ژن آن‌ها در بافت چربی حیوانات چاق و انسان افزایش می‌یابد.^۷ این سایتوکاین در تنظیم چندین فرآیند فیزیولوژیکی مانند کنترل فشارخون، تنظیم سیستم ایمنی، رگ‌زایی و التهاب نقش دارد.^۸ کیمیرین به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی جدید استروئیدوزنر فولیکولی ناشی از FSH عمل می‌کند و ممکن است در پاتوژنز PCOS نقش داشته باشد.^۹ همچنین کیمیرین در سرم زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد.^{۱۰} رزیستین نیز آدیپوکین پیش التهابی است که حدود ۲۰ سال پیش، برای اولین بار در موش‌ها شناسایی شد.^{۱۱} به نظر می‌رسد پلی‌پتید رزیستین، یک سایتوکاین پیش التهابی باشد که در پاتوژنز مقاومت به انسولین با واسطه چاقی و دیابت نوع ۲، حداقل در مدل‌های جوندگان نقش دارد.^{۱۲}

گیاهان یک‌ساله معطر انیسون (*Pimpinella anisum*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) متعلق به خانواده Apiaceae، در مناطق مدیترانه، آفریقا و خاورمیانه، جزو گیاهان دارویی سنتی مؤثر در درمان PCOS است که بوی بسیار شیرینی دارند.^{۱۳} ترانس-آنتول (Trans-anethole) [۱-متوکسی-۴- (۱-پروپنیل) بنزن]، ترکیب معطر و ماده مؤثر اصلی موجود در روغن این گیاهان بوده که دارای کاربردهای تجاری فراوان در صنایع غذایی، دارویی و عطرسازی است و به عنوان ماده طعم‌دهنده در تهیه فراورده‌های بهداشتی کاربرد دارد.^{۱۴} این ماده ترکیبی با خاصیت فیتواستروژن و استروئیدوزنیک قوی بوده،^{۱۵} که دارای خواص و اثرات ضد اسپاسم، ضد درد، ضد

مدت ۱۵ دقیقه دیگر به فاز بی‌رنگ RNA موجود در میکروتیوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب بی‌رنگ حاوی RNA، به مدت ۱۵ دقیقه دیگر با استفاده از دستگاه حمام خشک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا در آب حل شود. رسوب RNA استخراج‌شده در ۳۰ میکرولیتر آب حل شد و تا زمان سنتز cDNA در دمای ۲۰- درجه فریز شد.^{۲۵} کیفیت و غلظت RNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ تعیین شد. بعد از مشخص شدن غلظت و خلوص RNA های استخراج‌شده، با استفاده از کیت شرکت تاکارا (TAKARA) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اقدام به ساخت cDNA گردید.^{۲۰} ساخت رشته cDNA به کمک پرایمر اختصاصی ژن‌ها، با اتصال اختصاصی به نقاط مختلفی به رشته RNA انجام شد جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شده و توسط شرکت Roche سنتز شد.^{۲۰} لیست پرایمرها و توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در تکنیک Real time PCR، به منظور بررسی سطح بیان ژن‌های TNF- α ، کیمیرین و رزیستین، ارزیابی نمونه‌های بافتی مورد آزمایش، با استفاده از دستگاه Light Cycler 96 و رنگ syber green I تعیین شد.^{۲۰} برای حصول اطمینان از کارایی پرایمرها برای ژن‌های موردنظر با استفاده از cDNA، واکنش Real time PCR با دو تکرار انجام گرفت. در واکنش PCR، غلظت ۱۰ میکرومولار پرایمرها تهیه و به‌عنوان محلول کاری استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده ژن‌های کیمیرین، رزیستین و TNF- α

توالی در جهت '۵' به '۳' (از چپ به راست)	
CTAAAGCAAAGCCATGAAGTGCC	سنس کیمیرین
TGAGAAGAACAGGTCATCAGCAC	آنتی‌سنس کیمیرین
ACTACGATGCTCAGAAACACACG	سنس TNF- α
AGACATCTTCAGCAGCCTTGTG	آنتی‌سنس TNF- α
GACGGTTGATTGAGAACTGA	سنس رزیستین
TTGTGTATTTCCAGACCTCTC	آنتی‌سنس رزیستین

به علت اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمالی بودند، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقایسه تفاوت کمی میانگین داده‌ها در گروه‌های آزمایشی و برای مقایسه تفاوت کیفی میانگین داده‌ها از آزمون تعقیبی Tukey و با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 صورت گرفت. $P < 0.05$ به‌عنوان تفاوت مقدار معنی‌دار گروه‌ها مورد ملاک قرار گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۶ صورت گرفت.

Biotechrabbit (آلمان). دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از: ترازوی دقیق، سرنگ انسولینی، سمپلر، گرایندر، سانتریفیوژ یخچال‌دار، حمام خشک (شرکت Sigma)، نانودراپ (Nano drop) (شرکت Thermo Scientific آمریکا)، دستگاه هوموژنایزر و ترموسایکلر (Thermal cycler) (شرکت Tomy آمریکا). از روغن کنگد برای حل کردن استرادیول والرات استفاده شد. روش مورد استفاده در این مطالعه برای ابتلای رت‌های ماده به PCOS، القاء هورمونی با استفاده از تزریق داخل عضلانی استرادیول والرات بود. در این روش، بعد از انجام واژیناسیون و تعیین مرحله استروس در موش‌های صحرایی ماده، تزریق داخل عضلانی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات صورت گرفت. واژیناسیون طی روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰، برای بررسی ابتلای موش‌های صحرایی به PCOS انجام گرفت.^۴ ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات و با نامنظم شدن سیکل استروس و وقوع استروس پایدار و تأیید وضعیت پلی-کیستیک با برش گیری از تخمدان، تزریق داروی ترانس-آنتول به‌صورت درون صفاقی انجام شد.^{۱۶،۴} الگوی حجم و مدت‌زمان تزریق بر اساس تحقیقات قبلی بوده است.^{۱۶،۴}

موش‌های صحرایی ماده با محدوده وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم به‌صورت تصادفی به شش گروه ۶ تایی تقسیم شدند؛ گروه شاهد که ۰/۵ میلی‌لیتر سالیین به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. دو گروه آزمایشی ترانس-آنتول که غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه آزمایشی PCOS که ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات حل‌شده در روغن کنگد را به‌صورت تزریق داخل عضلانی دریافت کردند و دو گروه آزمایشی PCOS تحت درمان با ترانس-آنتول، که ۶۰ روز بعد از ابتلای به PCOS، غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول را دریافت کردند.

یک روز پس از آخرین تزریق داروها و به‌منظور معدوم کردن موش‌های صحرایی، تزریق داخل صفاقی ۰/۲ میلی‌لیتر از ترکیب ماده بیهوشی کتامین و زایلازین به ازای هر ۱۰۰ گرم از وزن بدن موش‌های صحرایی با استفاده از سرنگ انسولین، صورت گرفت. با ایجاد برش و کنار زدن پوست و لایه‌های عضلانی ناحیه شکمی، حدود ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های چربی احشایی در میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری DEPC قرار داده شد و تا زمان استخراج RNA، در نیتروژن مایع منفی ۸۰ فریز شد. نمونه‌های چربی جداشده با یک میلی‌لیتر از محلول تریازول در دستگاه هوموژنایزر هموژن شده. به‌منظور جداسازی فازهای مختلف RNA، DNA و پروتئین‌ها، با اضافه شدن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، بافت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه هموژنیزه‌شده و روی یخ انکوبه شد. ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به

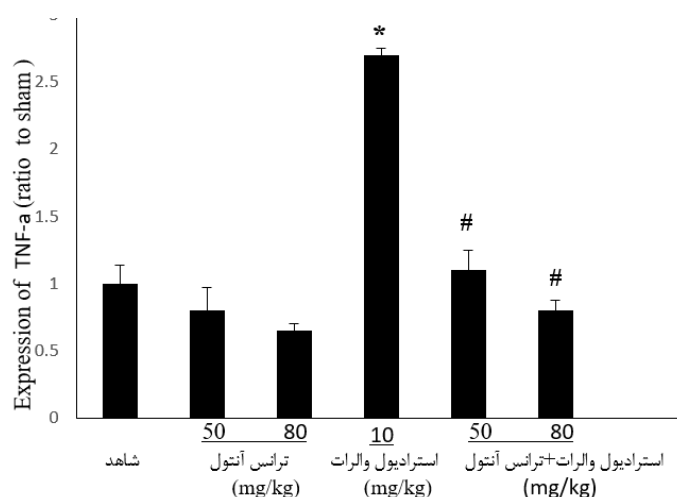
یافته‌ها

بروز عارضه التهاب بافت چربی در رت‌های PSOC دخیل باشد. علاوه بر این، تزریق داخل‌صفاقی غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، ۶۰ روز بعد از تزریق داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب کاهش اثر استرادیول والرات بر بیان ژن کیمیرین شد (نمودار ۲، $P < 0.05$).

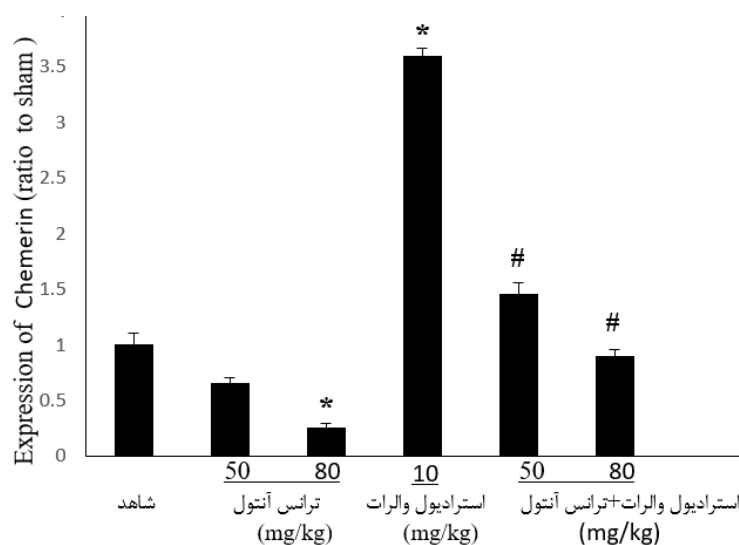
تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey نشان داد که تزریق داخل‌صفاقی غلظت بالای ترانس-آنتول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در موش‌های صحرای ماده، موجب کاهش معنی‌دار در بیان ژن رزیستین به‌عنوان دیگر میانجی سایتوکاین‌های التهابی در بافت چربی احشایی نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۳، $P < 0.05$). در صورتی‌که اثر غلظت پایین این دارو بر بیان ژن مذکور معنی‌دار نبود (نمودار ۳، $P > 0.05$). تجویز داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب افزایش معنی‌دار در بیان ژن مذکور شد (نمودار ۳، $P < 0.05$ ، که افزایش بیان این ژن نیز ممکن است در بروز عارضه التهاب بافت چربی، به علت القاء PSOC در این رت‌ها نقش داشته باشد. علاوه بر این، تزریق داخل‌صفاقی هر دو غلظت ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، ۶۰ روز بعد از تزریق داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب کاهش اثر استرادیول والرات بر بیان ژن رزیستین شد (نمودار ۳، $P < 0.05$).

تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey نشان داد که تزریق داخل‌صفاقی غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول در موش‌های صحرای ماده، تغییری معنی‌دار در بیان ژن $TNF-\alpha$ ، به‌عنوان یکی از سایتوکاین‌های التهابی در بافت چربی احشایی نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۱، $P > 0.05$). تزریق داخل عضلانی تک غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب افزایش معنی‌دار در بیان ژن مذکور شد (نمودار ۱، $P < 0.05$ ، که افزایش بیان این ژن ممکن است در بروز عارضه التهاب بافت چربی در رت‌های PSOC دخیل باشد. علاوه بر این، تزریق داخل‌صفاقی غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، ۶۰ روز بعد از تزریق داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب کاهش اثر استرادیول والرات بر بیان ژن مذکور شد (نمودار ۱، $P < 0.05$).

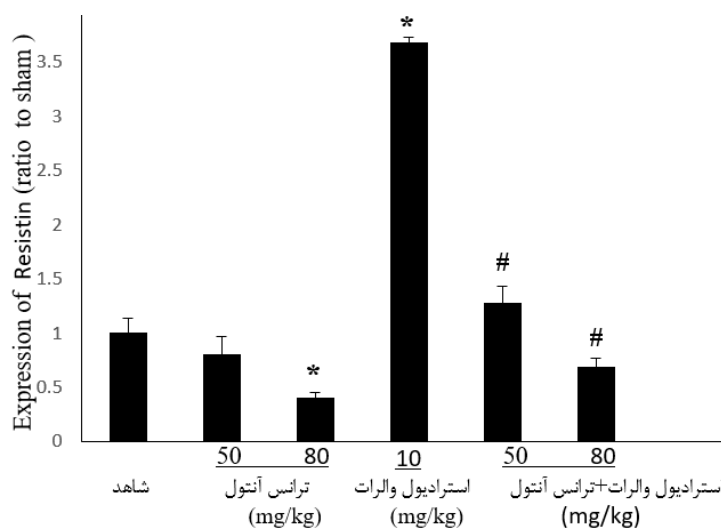
تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey نشان داد که تزریق داخل‌صفاقی غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول در موش‌های صحرای ماده، موجب کاهش معنی‌دار در بیان ژن کیمیرین به‌عنوان دیگر میانجی سایتوکاین‌های التهابی در بافت چربی احشایی نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۲، $P < 0.05$). تزریق داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب افزایش معنی‌دار در بیان ژن مذکور شد (نمودار ۲، $P < 0.05$ ، که افزایش بیان این ژن نیز ممکن است در



نمودار ۱. تأثیر تزریق ترانس-آنتول، استرادیول والرات و برهم‌کنش اثر آن‌ها بر میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ SEM بیان شده‌اند (علامت * بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل و علامت # بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه دریافت‌کننده استرادیول والرات است).



نمودار ۲. تأثیر تزریق ترانس-آنتول، استرادیول والرات و برهم‌کنش اثر آن‌ها بر میزان بیان ژن کیمیرین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM بیان شده‌اند (علامت * بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل و علامت # بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه دریافت‌کننده استرادیول والرات است).



نمودار ۳. تأثیر تزریق ترانس-آنتول، استرادیول والرات و برهم‌کنش اثر آن‌ها بر میزان بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM بیان شده‌اند (علامت * بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل و علامت # بیانگر $P < 0.05$ نسبت به گروه دریافت‌کننده استرادیول والرات است).

بحث

بخشی از نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق درون‌صفافی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات موجب افزایش معنی‌دار سطح بیان هر سه ژن $TNF-\alpha$ ، کیمیرین و رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده شد. علیرغم شیوع بالای PCOS و تأثیر مرتبط آن بر سلامت زنان، اتیولوژی یا همان رابطه علت و معلولی بین ویژگی‌های تولیدمثل و متابولیک در این سندرم، هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است.^{۲۱} نتایج مطالعه

در این مطالعه، تأثیر تزریق درون‌صفافی غلظت‌های ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات به‌صورت داخل عضلانی و نیز برهم‌کنش اثر تزریق این داروها بر میزان بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، کیمیرین و رزیستین به‌عنوان میانجی‌های سایتوکاین‌های التهابی در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده مورد بررسی قرار گرفت.

ممکن است پاسخ‌های التهابی را کاهش دهند.^{۲۸} اثرات استروئیدوژنیک قوی، ضدالتهابی و ضد هیپرگلیسمی ترانس-آنتول در تعدادی از تحقیقات پیشین گزارش شده است.^{۱۳} انگ و همکاران در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثرات ضدالتهابی ترانس-آنتول در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، با تزریق داخل صفاقی غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم این ماده به موش‌های سوری نژاد BALB/C، گزارش کردند که غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، تعداد ماکروفاژها و نوتروفیل‌های پیش التهابی و همچنین تولید واسطه‌های پیش التهابی مانند TNF- α و نیتریک اکساید (Nitric Oxide= NO) در موش‌ها را کاهش می‌دهد، در صورتی که بر مقدار IL-6 تأثیری نداشت.^{۱۹} اگرچه در مطالعه حاضر، تجویز درون صفاقی ترانس-آنتول تغییری معنی‌دار در بیان ژن TNF- α ایجاد نکرد، ولی بیان ژن‌های کیمیرین و رزیستین، به عنوان واسطه‌های پیش التهابی در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی کاهش یافت. ممکن است یکی از دلایل تفاوت در نتایج اثر اعمال ترانس-آنتول بر بیان ژن TNF- α در این مطالعه با مطالعه کانگ و همکارانش، ناشی از تفاوت در غلظت بکار رفته ترانس-آنتول در این مطالعات باشد. چندین مکانیسم برای اثرات ترانس-آنتول در سلول‌ها پیشنهاد شده است. ممکن است مکانیسم احتمالی اثر ترانس-آنتول بر کاهش بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای التهابی مانند کیمیرین در رت‌های مبتلا به PSOC، به واسطه مهار مسیر Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells =NF-KB باشد.^{۲۹} پیشنهاد شده که خواص ضدالتهابی ترانس-آنتول با کاهش واسطه‌های پیش التهابی، از جمله TNF- α ، متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9=metallopeptidase 9) و NO اعمال می‌گردد.^{۱۹} برخی محققین نیز پیشنهاد کرده‌اند که ترانس-آنتول با خنثی سازی اثرات مضر رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس اکسیداتیو در فولیکول‌های تخمدان، به بهبود روند بیماری کمک می‌کند.^۸ ترانس-آنتول می‌تواند اثر محافظتی خود بر کبد موش‌های دیابتی را با کاهش یا حذف گونه‌های واکنش‌پذیر مضر اعمال کند.^{۳۰}

نتایج دیگر این مطالعه نشان داد که تزریق درون صفاقی نشان داد که تزریق داخل صفاقی هردو غلظت ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترانس-آنتول، ۶۰ روز بعد از تزریق داخل عضلانی غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات، موجب بهبودی میزان بیان ژن‌های TNF- α ، کیمیرین و رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی ماده شد و ممکن است در کاهش عوارض التهابی ناشی از القاء PSOC، به دلیل تجویز استرادیول والرات مؤثر باشد. در مطالعات قبلی، گزارش‌هایی مبنی بر کارآمدی

حاضر همسو با نتایج مطالعات قبلی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نیز تعدادی از نتایج مطالعات بالینی است. غفورنیا و همکارانش در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، گزارش کردند که تزریق زیرجلدی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرادیول والرات به منظور ابتلا رت‌های ماده به PCOS، موجب افزایش سطح LH و تستوسترون شده و سطح FSH این رت‌ها را نسبت به گروه کنترل کاهش داد.^۴ سطوح پلاسمایی میانجی‌گرهای سایتوکاین‌های التهابی نظیر TNF- α ، IL-6، رزیستین و کیمیرین که از بافت چربی ترشح می‌شوند، در زنان مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد.^۲ سایتوکاین پیش التهابی TNF- α به عنوان واسطه مقاومت به انسولین در PSOC شناخته می‌شود و تولید آن به علت هیپرگلیسمی و هایپرآندروژنی ناشی از PSOC، افزایش می‌یابد.^{۳۳} همچنین ممکن است که سایتوکاین‌های پیش التهابی نظیر IL-1، IL-6 و TNF- α موجب افزایش بیان mRNA رزیستین شوند.^{۳۳} بالدانی و همکاران در مطالعه بالینی در سال ۲۰۱۹ که بر روی ۱۵۱ زن با تشخیص PSOC انجام دادند، گزارش کردند که در این زنان، بیان ژن رزیستین و غلظت سرمی آن به عنوان نشانگر زیستی PCOS، افزایش می‌یابد.^{۳۴} با توجه به اینکه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species=ROS) میتوکندریایی ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌ها، موجب افزایش ترشح کیمیرین در سلول‌ها شده که در نهایت منجر به بروز بیماری می‌گردد،^{۳۵} و نیز اینکه ممکن است کیمیرین در توقف رشد فولیکول‌های آنترال مرتبط با حالت پیش التهابی هیپرآندروژنیک مشخصه PCOS نقش داشته باشد،^{۳۶} گزارش شده که بیماران مبتلا به PCOS، غلظت کیمیرین سرم بالاتری در مقایسه با زنان سالم دارند.^{۳۷} همچنین میانگین بیان ژن کیمیرین در موش‌های مبتلا به PSOC افزایش می‌یابد.^{۳۷}

نتایج دیگر این مطالعه نشان داد که تزریق درون صفاقی ترانس-آنتول موجب کاهش میزان بیان ژن‌های کیمیرین و رزیستین در بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی شد، در صورتی که بر بیان ژن TNF- α در بافت مذکور تأثیر معنی‌داری نداشت. مصرف خوراکی اسانس رازیانه بیماری‌های التهابی در موش‌ها را مهار می‌کند.^{۲۸} گزارش شده که عصاره رازیانه می‌تواند سطح سرمی استروژن، پروژسترون و پرولاکتین را در موش‌های ماده افزایش دهد، اما سطح تستوسترون، انسولین و LH را کاهش می‌دهد.^{۳۹} عصاره گیاه رازیانه سطوح LH و تستوسترون را در حیوانات PCOS کاهش می‌دهد.^{۳۰} برخی از این اثرات ضدالتهابی عصاره رازیانه ممکن است ناشی از خواص ضدالتهابی ترانس-آنتول باشد که نشان می‌دهد آنتول و اسانس‌های حاوی آنتول

کیمیرین، رزیستین، LH و FSH و هورمون‌های استرادیول و تستوسترون و نیز میزان بیان ژن‌های گرلین، نوروپپتید Y، لپتین، IL-6 و IL-1 در موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS بررسی شود.

قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز بابت تأمین اعتبار لازم، قدردانی می‌گردد.

مشارکت پدیدآوران

سید مهدی بانان خجسته ایده‌پرداز و طراح تحقیق، مهسا دیندار در اجرای پروتکل آزمایشات، فریبا محمودی در تحلیل و تفسیر داده‌ها، حاتم احمدی در رسم نمودارها و نگارش نهایی مقاله، حمیرا حاتمی نعمتی در بررسی و ویرایش مقاله ایفای نقش کردند.

منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز صورت پذیرفت.

دسترس‌پذیری داده‌ها

مجموعه داده‌های ایجادشده و یا تجزیه و تحلیل در طول مطالعه فعلی در صورت درخواست از نویسنده مربوطه ارائه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

در اجرای این پژوهش، ملاحظات اخلاقی مطابق با شیوه‌نامه کمیته اخلاق دانشگاه تبریز در سال ۱۳۹۹ با کد اخلاق IR.TABRIZU.REC.1399.037 در نظر گرفته شده است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع برای انتشار این مقاله وجود ندارد.

استفاده از داروهای مؤثر در درمان دیابت همچون متفورمین و پیوگلیتازون بر کاهش بیان ژن‌های التهابی بافت چربی آمده است.^۹ درمان متفورمین و پیوگلیتازون در زنان مبتلا به PCOS، مقاومت به انسولین را بهبود می‌بخشید و بیان کیمیرین تخمدان را کاهش داد.^{۱۰} کاهش سطح سرمی رزیستین، با کاهش چربی و بهبود حساسیت به انسولین در جوندگان همراه است،^{۳۰} همچنین با وجود اینکه تا به حال گزارشی مبنی بر کارآمدی تجویز ترانس-آنتول در کاهش مقدار سرمی TNF- α ، کیمیرین و رزیستین و یا کاهش بیان این ژن‌ها در زنان و یا حیوانات آزمایشگاهی ماده مبتلا به PCOS در مطالعات قبلی نیامده است. با این وصف برخی نتایج مطالعات پیشین مؤید کارآمدی تجویز ترانس-آنتول در حیوانات آزمایشگاهی ماده مبتلا به PCOS است.^{۱۸} مرادی و همکارانش گزارش کردند که تجویز ترانس-آنتول در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین تأثیر را بر بسیاری از عوامل هورمونی در حیوانات PCOS دارد و چنین نتیجه‌گیری کردند که اثر ترانس-آنتول بر PCOS وابسته به دوز است.^{۱۸} این دارو سطح سرمی انسولین، چربی خون و DHEAS را به میزان قابل‌توجهی در موش‌های مبتلا به PCOS کاهش می‌دهد.^{۱۸} می‌توان نتیجه گرفت که ترانس-آنتول موجب بهبودی تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی در موش‌های PCOS شده و ممکن است به‌عنوان یک درمان مفید برای ارزیابی‌های بالینی بیشتر در بیماران PCOS پیشنهاد شود.^{۱۸}

نتیجه‌گیری

از کاهش سطح بیان ژن‌های مربوط به سایتوکاین‌های التهابی بافت چربی احشایی در رت‌های مبتلا به PSOC، در اثر بکارگیری غلظت‌های ترانس-آنتول در این مطالعه، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تجویز ترانس-آنتول در زنان مبتلا به PSOC، ممکن است در کاهش عوارض التهابی مربوط به این سندرم مؤثر باشد؛ اگرچه نتیجه‌گیری قطعی این ادعا نیاز به مطالعات آزمایشگاهی بیشتر در حیوانات آزمایشگاهی و نیز مطالعات بالینی بیشتری دارد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود اثرات تزریق داخل صفاقی ترانس-آنتول بر غلظت سرمی TNF- α ،

References

1. Ali HI, Elsawy ME, Khater NH. Ultrasound assessment of polycystic ovaries: ovarian volume and morphology; which is more accurate in making the diagnosis?!. The Egyptian journal of radiology and nuclear medicine. 2016;47(1):347-50. doi: 10.1016/j.ejnm.2015.10.002.
2. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. BMC medicine. 2010;8:1-10. doi: 10.1186/1741-7015-8-41.

3. Parida S, Siddharth S, Sharma D. Adiponectin, obesity, and cancer: clash of the bigwigs in health and disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(10):2519. doi: 10.3390/ijms20102519.
4. Ghafurniyan H, Azarnia M, Nabiuni M, Karimzadeh L. The effect of green tea extract on reproductive improvement in estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome in rat. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2015;14(4):1215-33.
5. Kabiri N, Tabandeh MR, Tabatabaie SR. Beneficial effects of pioglitazone and metformin in murine model of polycystic ovaries via improvement of chemerin gene up-regulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;22:39. doi: 10.1186/2008-2231-22-39.
6. Ren Y, Zhao H, Yin C, Lan X, Wu L, Du X, et al. Adipokines, hepatokines and myokines: focus on their role and molecular mechanisms in adipose tissue inflammation. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:873699. doi: 10.3389/fendo.2022.873699.
7. Zhang LQ, Van Haandel L, Xiong M, Huang P, Heruth DP, Bi C, et al. Metabolic and molecular insights into an essential role of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Cell death & disease*. 2017;8(3):e2705. doi: 10.1038/cddis.2017.132.
8. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB life*. 2014;66(1):19-26. Doi: 10.1002/iub.1242.
9. Wang Q, Kim JY, Xue K, Liu JY, Leader A, Tsang BK. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology*. 2012;153(11):5600-11. doi: 10.1210/en.2012-1424.
10. Kusminski CM, McEernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clinical science*. 2005;109(3):243-56. Doi: 10.1042/CS20050078.
11. Mahboubi M. *Foeniculum vulgare* as valuable plant in management of women's health. *Journal of menopausal medicine*. 2019;25(1):1-14. doi: 10.6118/jmm.2019.25.1.1.
12. Khosravi AR, Shokri H, Minooeianhaghighi M. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus* by *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides*, and *Nigella sativa* essential oils. *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(12):1275-80. doi: 10.1089/fpd.2011.0929.
13. Khan RU, Fatima A, Naz S, Ragni M, Tarricone S, Tufarelli V. Perspective, opportunities and challenges in using fennel (*Foeniculum vulgare*) in poultry health and production as an eco-friendly alternative to antibiotics: A review. *Antibiotics*. 2022;11(2):278. doi: 10.3390/antibiotics11020278.
14. Sheikh BA, Pari L, Rathinam A, Chandramohan R. Trans-anethole, a terpenoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Biochimie*. 2015;112:57-65. doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.008.
15. Lowenstein EJ. Diagnosis and management of the dermatologic manifestations of the polycystic ovary syndrome. *Dermatologic therapy*. 2006;19(4):210-23. doi: 10.1111/j.1529-8019.2006.00077.x.
16. Moradi Negahdari F, Hadjzadeh MA, Gholamnezhad Z, Samadi Noshahr Z, Keshavarzi Z. A comparison between the effect of trans-anethole and metformin on biochemical parameters of polycystic ovary syndrome in rats. *Avicenna J Phytomed*. 2021;11(5):484-93. doi: 10.22038/AJP.2021.55679.2785.
17. Kang P, Kim KY, Lee HS, Min SS, Seol GH. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life sciences*. 2013;93(24):955-61. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.014.
18. Kuba Y, Kyan H, Arakaki E, Takara T, Kato T, Okano S, et al. Molecular epidemiological study of mumps epidemics of 2015 in Okinawa, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*. 2017;70(3):329-32. Doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.390.
19. Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, et al. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Human reproduction update*. 2009;15(3):297-307. doi: 10.1093/humupd/dmp006.
20. Shaaban Z, Khoradmehar A, Amiri-Yekta A, Shirazi MR, Tamadon A. Pathophysiologic mechanisms of obesity-and chronic inflammation-related genes in etiology of polycystic ovary syndrome. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019 Dec;22(12):1378-86. doi: 10.22038/IJBMS.2019.14029.
21. Baldani DP, Skrgatic L, Kasum M, Zlopasa G, Kralik Oguic S, Herman M. Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality. *Gynecological Endocrinology*. 2019;35(5):401-5. doi: 10.1080/09513590.2018.1534096.
22. Shen W, Tian C, Chen H, Yang Y, Zhu D, Gao P, et al. Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;55:73-82. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.011.

23. Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, Ramé C, Ducluzeau PH, Froment P, et al. Involvement of novel adipokines, chemerin, visfatin, resistin and apelin in reproductive functions in normal and pathological conditions in humans and animal models. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):4431. doi: 10.3390/ijms20184431.
24. Huang R, Yue J, Sun Y, Zheng J, Tao T, Li S, et al. Increased serum chemerin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship between insulin resistance and ovarian volume. *Clinica Chimica Acta*. 2015;450:366-9. doi: 10.1016/j.cca.2015.09.015.
25. Choi EM, Hwang JK. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*. 2004;75(6):557-65. doi: 10.1016/j.fitote.2004.05.005.
26. Zehra B, Khursheed AA. Polycystic ovarian syndrome: symptoms, treatment and diagnosis: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(6):875-80.
27. Sadrefozalayi S, Farokhi F. Effect of the aqueous extract of *Foeniculum vulgare* (fennel) on the kidney in experimental PCOS female rats. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2014;4(2):110-7.
28. Kamte SL, Ranjbarian F, Cianfaglione K, Sut S, Dall'Acqua S, Bruno M, et al. Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018;156:154-65. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.032.
29. Singh G, Maurya S, Catalan C, De Lampasona MP. Chemical constituents, antifungal and antioxidative effects of ajwain essential oil and its acetone extract. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(11):3292-6. doi: 10.1021/jf035211c.
30. Pandit K, Kumar A, Kaur S, Kumar V, Jain SK, Bhardwaj R, et al. Amelioration of oxidative stress by trans-Anethole via modulating phase I and phase II enzymes against hepatic damage induced by CCl4 in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(4):6317-33. doi: 10.1007/s11356-021-16070-z.