مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۲، ۱۴۹-۱۴۱

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,2:141-149, 2014

اثرات عصاره آبی گلرنگ بر دستگاه تناسلی موش ماده

سعید حبیبیان دهکردی[1*] محمدشادخواست[2] محمد هادی شاطری[3] جهانگیر کبوتری[1] پژمان میرشکرایی[4]

۱) گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

۲) گروه علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

۳) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

۴) گروه مامایی و بیماریهای تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد-ایران

(دریافت مقاله: ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۲، پذیرش نهایی: ۵ آذر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: گلرنگ از جمله داروهای گیاهی است که بسیاری از پژوهش‌ها بر استفاده از آن برای برطرف کردن مشکلات قاعدگی و بیماریهای دستگاه گردش خون تکیه دارند. گل‌های این گیاه از دیرباز بعنوان داروی محرک جنسی استفاده شده است. شواهدی نیز مبنی برکاربرد آن در درمان ناتوانی‌های جنسی و نازایی وجود دارد. **هدف:** با توجه به اثرات این گیاه روی ناباروری این مطالعه طراحی تا نقش عصاره آبی گلرنگ بر ساختار هیستومورفومتری دستگاه تناسلی موش ماده مورد بررسی قرار گیرد. **روش کار:** ۳۰ عدد موش ماده از نژاد (balb/c) به صورت تصادفی در ۳ گروه مساوی تقسیم شدند. در گروه اول عصاره گلرنگ به مدت ۴۵ روز متوالی با دوز ۴۰mg/kg به صورت دهانی (گاواژ) خورانده شد. در گروه دوم عصاره گلرنگ با دوز ۸۰mg/kg به مدت ۴۵ روز به صورت دهانی خورانده شد. موش‌های گروه سوم (گروه شاهد) به همان مقدار، زمان و روش گروه‌های تجربی، آب دریافت کردند. نتایج حاصل از مطالعه با برنامه های آماری ANOVA و Tukeys test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج نشان داد که استفاده طولانی مدت از عصاره‌ی گلرنگ، به طور معنی داری سبب افزایش وزن تخمدان‌ها در گروه‌های تجربی (گروه اول: ۰/۴±۰/۸، گروه دوم: ۰/۷±۱/۱) نسبت به گروه شاهد (۰/۶±۰/۴) می‌شود. مطالعات هیستومورفومتری نشان داد که عصاره گلرنگ به طور معنی داری سبب افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه (گروه اول: ۵۷±۳ و ۶۶±۹، گروه دوم: ۲۵±۳/۲۵ و ۳±۹/۰۸، بالغ (گروه اول: ۱۷±۱/۱ و ۵۴/.±۷/۶۶، گروه دوم: ۱۳±۱/۲ و ۷۵±۸) و جسم زرد (گروه اول: ۷۵±۴/۷۵ و ۲۹±۵/۲۷، گروه دوم: ۴۷±۴/۷۵ و ۳۱±۵/۴) و کاهش تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته (گروه اول: ۲۸±۲/۵، گروه دوم: ۶۲±۲/۲۵) می‌شود. قطر لایه گرانولوزا (گروه اول: ۳±۴/۵۸، گروه دوم: ۳/۲۵±۰/۳) و کومولوس اووفروس (گروه اول: ۱۸±۲/۵، گروه دوم: ۱۵±۲/۵۸) نیز در گروه‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه شاهد (۳۳/± ۴/۶۶ و ۱۵±۱/۸۷) به طور معنی‌داری تغییر یافت. عصاره‌ی گلرنگ تأثیر قابل توجهی بر ساختار هیستومورفومتری رحم نداشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** می‌توان نتیجه گرفت که عصاره آبی گلرنگ بیشتر بر تخمدان ها در مقایسه با رحم موثر بوده و ممکن است اثرات مثبتی بر باروری در موش‌های ماده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: گلرنگ، هیستومورفومتری، دستگاه تناسلی، موش

مقدمه

استفاده از گیاهان داروئی برای درمان بیماریها از دیرباز در جوامع بشری معمول بوده و هم اکنون نیز یکی از مهمترین منابع تأمین دارو برای پیشگیری و درمان بیماریها به‌شمار می‌روند (۱). یکی از این گیاهان، گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius L.* از خانواده کاسنی (Compositae) می‌باشد. گلرنگ گیاهی است یک ساله و یا دو ساله، علفی، بدون کرک، تیغ‌دار و رنگ‌ده. این گیاه دارای ساقه‌ای به ارتفاع ۴۰Cm تا ۷۰ و به رنگ سبز روشن یا مات و متمایل به آبی می‌باشد. گل‌های گیاه زرد یا زرد نارنجی، برگ آن تخم مرغی و سرنیزه‌ای است. گلبرگ‌های گلرنگ حاوی ۳۰٪ رنگدانه زرد کارتامیدین (Carthamidin) و ۰/۸۳٪ رنگدانه قرمز کارتامین (Carthamin) می‌باشند و برای رنگ کردن غذا، نوشیدنی‌ها، لوازم آرایشی و داروها استفاده می‌شوند (۴). ترکیبات اصلی گلرنگ شامل کلرانت (Clorant)، اسید فولیک، اسیدهای چرب ضروری است. کلرانت در اصل سافلاور زرد (Safflower yellow) و سافلاور قرمز (Safflower red) است. سافلاور زرد فعال ترین ترکیب گلرنگ و محلول در آب است (۲۵). گلبرگ‌های گلرنگ دارای اسیدهای چرب غیراشباع از جمله لینولئیک اسید (Linoleic Acid)، گامالینولئیک اسید (Gamma-Linoleic Acid)، آلفالینولئیک اسید (Alpha-Linoleic Acid) و همچنین آراشیدونیک اسید (Arachidonic Acid) می‌باشند (۱۱).

گلرنگ از جمله داروهای گیاهی است که در بسیاری از نقاط دنیا، طب سنتی بر استفاده از آن به‌صورت دم کرده، پودر و یا روغن برای برطرف کردن مشکلات قاعدگی و بیماریهای دستگاه گردش خون تکیه دارد. همچنین گل‌های این گیاه از دیرباز به‌عنوان داروی محرک جنسی استفاده شده است. شواهدی نیز مبنی بر کاربرد چای آن در درمان ناتوانی‌های جنسی و نازایی وجود دارد (۶،۱۲). این شواهد لزوم بررسی علمی این گیاه و اثرات آن را بر بدن مطرح می‌سازد. از این رو مطالعه حاضر

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶-۴۴۲۴۴۰۱-۰۳۸۱ نمابر: ۴۴۲۴۴۲۷-۰۳۸۱ Email: habibian@vet.skuac.ir

به منظور تعیین اثرات عصاره آبی گلرنگ بر ساختار هیستومورفومتری دستگاه تناسلی ماده در موش اجرا شده است.

مواد و روش کار

عصاره‌گیری: با استفاده از دستگاه سوکسله اقدام به عصاره گیری از ۱۰۰g از پودر گل رنگ شد. به منظور غلیظ سازی، ابتدا عصاره به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفت و سپس عصاره گلرنگ به مدت ۲ ساعت در دستگاه روتاری با دمای $65^{\circ}C$ تقطیر شد. محصول بدست آمده تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ایی استریل تیره در یخچال نگهداری گردید.

آماده سازی و گروه بندی: این پژوهش بر روی ۳۰ سر موش سوری با نام علمی Mus musculus از واریته آلبینو (Albino) و جنس ماده با میانگین وزنی حدود ۲۷ تا ۳۲g و سن ۷ تا ۸ هفته انجام گردید. قبل از شروع آزمایش به منظور سازگاری با شرایط محیط جدید، حیوانات به مدت ۲ هفته در شرایط محیطی $27^{\circ}C$ -۲۳ و چرخه شبانه روزی روشنایی- تاریک ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

در طی مدت آزمایش، موش‌ها به صورت آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان (جوانه خراسان) دسترسی داشتند.

قبل از گروه‌بندی، موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن و به طور تصادفی در ۳ گروه به شرح زیر قرار گرفتند.

گروه اول: موش‌هایی که مقدار ۴۰mg/kg عصاره گلرنگ از راه دهان (گاواژ) به مدت ۴۵ روز دریافت کردند.

گروه دوم: موش‌هایی که مقدار ۸۰ mg/kg عصاره گلرنگ از راه دهان به مدت ۴۵ روز دریافت کردند.

گروه سوم: موش‌های شاهد در این مدت معادل حجم عصاره خورانده شده به موش‌های گروه اول و دوم آب مقطر از راه دهان دریافت کردند.

نمونه‌گیری: در پایان روز ۴۵، موش‌ها مجدداً با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن و سپس با استفاده از کلروفرم و در ظرف دسیکاتور بی‌هوش و در نهایت کشته شدند. با استفاده از اسکالپل، پنس و قیچی، حفره شکمی آنها باز و بعد از کنار زدن روده‌ها، رحم، شاخ‌های رحمی، لوله‌های تخم بر مارپیچی و تخمدان‌ها نمایان شدند. جهت انجام مطالعات هیستومورفومتری، تخمدان‌ها و رحم خارج و پس از شستشوی با سرم فیزیولوژی به ظروف شماره‌دار حاوی محلول تثبیت کننده فرمالین ۱۵٪ بافر (مِرک، آلمان) منتقل و در یخچال نگهداری شدند. برای تثبیت بهتر بافت‌ها ۲۴ ساعت بعد محلول فرمالین با محلول فرمالین بافر جدید جایگزین گردید. از این ارگان‌ها پس از انجام عملیات معمول بافت شناسی، مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی به روش معمول هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و در نهایت نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. لازم به توضیح است که پس از خارج کردن هر تخمدان از بدن و شستشوی با سرم فیزیولوژی، ابتدا آن را وزن کرده و سپس به ظرف حاوی محلول تثبیت کننده منتقل می‌کردیم.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری Prism 3 و با روش‌های آماری پراش یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی Tukeys test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. از نظر آماری اختلاف نتایج بین گروه‌های تحت بررسی در سطح $p<0/05$ معنی‌دار قلمداد گردید.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده افزایش وزن بدن در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد بوده است ولی این افزایش معنی‌دار نبوده است ($p>0/05$). عصاره آبی گلرنگ در هر دو غلظت مورد استفاده باعث افزایش معنی‌دار وزن تخمدان‌های موش‌های مورد آزمایش در هر دو گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد شده است ($p<0/05$). این نتایج همچنین نشان داد که اختلاف وزن مشاهده شده بین تخمدان‌های موش‌های گروه‌های تجربی معنی‌دار نیست ($p>0/05$، جدول ۱).

تعداد فولیکول‌های اولیه یا ابتدایی در گروه دریافت کننده گلرنگ با غلظت ۴۰mg/kg نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). ولی در گروه دریافت کننده گلرنگ با غلظت ۸۰ mg/kg در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های اولیه مشاهده شده و وجود داشت ($p<0/05$). بین گروه‌های تجربی از نظر تعداد متوسط فولیکول‌های اولیه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). در متوسط تعداد فولیکول‌های ثانویه و تعداد فولیکول‌های بالغ بین گروه‌های تجربی با هم هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). ولی تفاوت مشاهده شده بین گروه‌های تجربی با گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<0/05$). متوسط تعداد فولیکول‌های تحلیل‌رفته بر خلاف فولیکول‌های دیگر در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته‌اند ($p<0/05$). این در حالی است که تفاوت مشاهده شده در تعداد متوسط فولیکول‌های تحلیل یافته در گروه‌های تجربی معنی‌دار نبود ($p>0/05$). در متوسط تعداد جسم زرد بین گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود ($p<0/05$). ولی این تفاوت بین گروه‌های تجربی با هم معنی‌دار نیست ($p>0/05$، جدول ۱، تصویر ۱).

متوسط قطر اووسیت‌ها در فولیکول‌های اولیه در گروه‌های دریافت کننده‌ی گلرنگ با غلظت ۴۰ mg/kg و ۸۰ mg/kg علیرغم افزایش نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). این در حالی بود که متوسط قطر اووسیت‌ها در فولیکول‌های ثانویه و فولیکول‌های بالغ در گروه‌های دریافت کننده گلرنگ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$). بین گروه‌های تجربی از نظر متوسط قطر اووسیت‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). متوسط قطر

جدول ۱. میانگین و خطای معیار پارامترهای اندازه‌گیری شده در گروه‌های مختلف. (*) در هر ردیف اختلاف با گروه شاهد معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

گروه‌ها	شاهد	گلرنگ (۴۰ mg/kg)	گلرنگ (۸۰ mg/kg)
وزن موش‌ها (g)	۳۰/۱±۰/۸۶	۳۲/۱۰±۰/۷۸	۳۱/۹۶±۱/۱۴
وزن تخمدان‌ها (g)	۰/۴±۰/۰۶	۰/۸±۰/۰۴(*)	۱/۱±۰/۰۷(*)
تعداد فولیکول اولیه	۸/۶۶۷±۱/۲	۱۵/۲۵±۲/۳۵	۲۴±۳/۳۴(*)
قطر فولیکول اولیه (µm)	۴/۶۲±۰/۴	۴/۸۳±۱/۱	۶/۱۶±۱/۳
تعداد فولیکول ثانویه	۲/۶۶±۰/۳۳	۳±۰/۵۷(*)	۳/۲۵±۰/۲۵(*)
قطر فولیکول ثانویه (µm)	۶/۸۷±۰/۳۶	۹±۰/۶۶(*)	۹/۰۸±۰/۳(*)
تعداد فولیکول بالغ	۰/۴±/۱۶	۱/۱±۰/۱۷(*)	۱/۲±۰/۱۳(*)
قطر فولیکول بالغ (µm)	۰/۳۷±۵/۳۷	۷/۶۶±۰/۵۴(*)	۸±۰/۷۵(*)
قطر لایه‌ی گرانولوزای فولیکول اولیه (µm)	۰/۴۱±۰/۰۸	۰/۹۱±۰/۱۶	۰/۹۱±۰/۰۸
قطر لایه‌ی گرانولوزای فولیکول ثانویه (µm)	۲/۵۸ ±۰/۰۸	۲/۵۸±۰/۱۶(*)	۱/۶۸ ±۰/۲۱(*)
قطر لایه‌ی گرانولوزای فولیکول بالغ (µm)	۴/۶۶ ±۰/۳۳	۴/۵۸ ±۰/۳(*)	۳/۲۵ ±۰/۳(*)
قطر لایه‌ی کومولوس اووفروس (µm)	۱/۸۷±۰/۱۵	۲/۵±۰/۱۸(*)	۲/۵۸±۰/۱۵(*)
تعداد فولیکول تحلیل‌یافته	۷±۰/۵۷	۲/۵±۰/۲۸(*)	۲/۲۵±۰/۶۲(*)
تعداد جسم زرد	۱/۳۳±۰/۳۳	۴/۷۵±۰/۷۵(*)	۴/۷۵±۰/۴۷(*)
قطر جسم زرد (µm)	۳/۶±۰/۲۱	۵/۲۷±۰/۲۹(*)	۵/۴±۰/۳۱(*)
تعداد عروق خونی	۱۱/۵±۲/۱	۲۰/۵±۰/۶۴(*)	۲۱±۰/۶۴(*)
حداکثر فضای حفره رحم (µm)	۱۱۰/۶۲±۰/۶۸	۱۰۹±۰/۶۳	۸۶±۰/۷۳
حداقل فضای حفره رحم (µm)	۲۱/۸۷±۰/۲۱۷	۱۸/۵±۰/۷۳	۱۰/۵±۰/۰۳۷
قطر اندومتریوم (µm)	۶۱/۵±۸/۵	۴۴/۲۵±۷/۴	۴۶/۴±۱/۸
قطر میومتریوم (µm)	۳۳/۵±۱/۵	۴۱±۵/۳	۳۳/۵±۴/۶
طول سلول‌های پوششی رحم (µm)	۱/۳۰±۰/۰۴۸	۱/۵۳±۰/۰۵۲	۱/۵۲±۰/۰۸۹
عرض سلول‌های پوششی رحم (µm)	۰/۵۴±/۰۱۰	۰/۶۵±/۰۳۴	۰/۵۶±۰/۰۲۴
طول هسته سلول‌های پوششی رحم (µm)	۰/۶۵±/۰۲۵	۰/۸۶±/۰۵۱	۰/۸۳±۰/۰۳۳
عرض هسته سلول‌های پوششی رحم (µm)	۰/۴۳±/۰۲۴	۰/۵۸±/۰۳۹	۰/۴۷±۰/۰۱۴

جسم زردهای موجود در تخمدان‌های گروه‌های تجربی نیز در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵، جدول ۱، تصاویر ۱و۲).

ضخامت لایه گرانولوزا در اطراف همه انواع فولیکول‌ها در همه گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد افزایش داشته است، ولی این افزایش تنها در مورد فولیکول‌های ثانویه و بالغ در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بوده است و بین گروه‌های تجربی تفاوت معنی‌داری دیده نشد (p<۰/۰۵، جدول ۱، تصویر ۲).

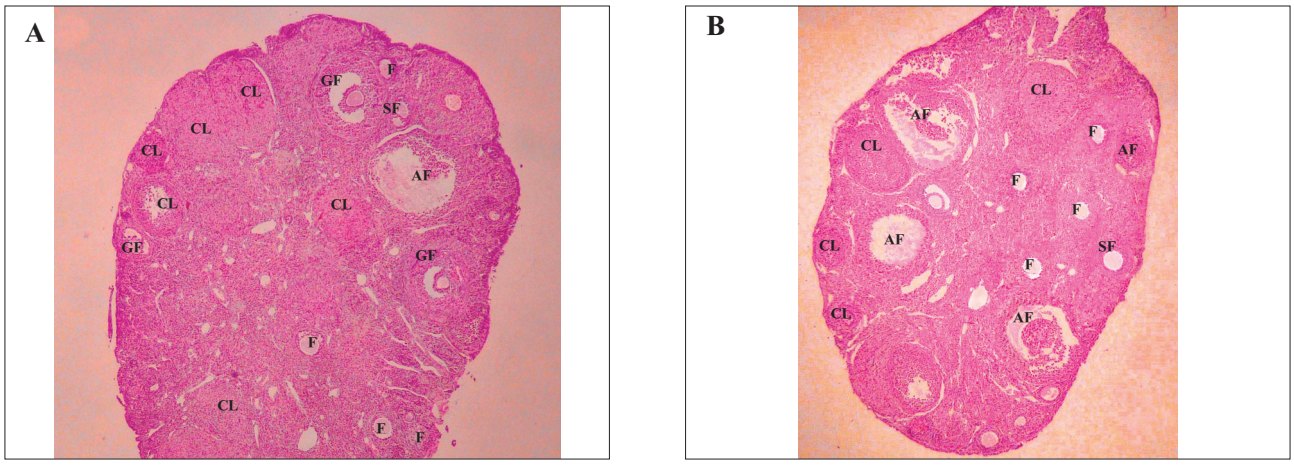
متوسط ضخامت لایه کومولوس اووفروس در گروه‌های تجربی با هم هیچ تفاوت معنی‌داری نداشته است (p>۰/۰۵). لازم به توضیح است که تفاوت مشاهده شده بین گروه‌های تجربی با گروه شاهد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵، جدول ۱، تصویر ۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در تعداد رگ‌های خونی در تخمدان‌های موش‌های گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵)، این در حالی است که بین گروه‌های تجربی دریافت کننده گلرنگ با غلظت‌های متفاوت هیچ گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (p>۰/۰۵، جدول ۱، تصویر ۳).

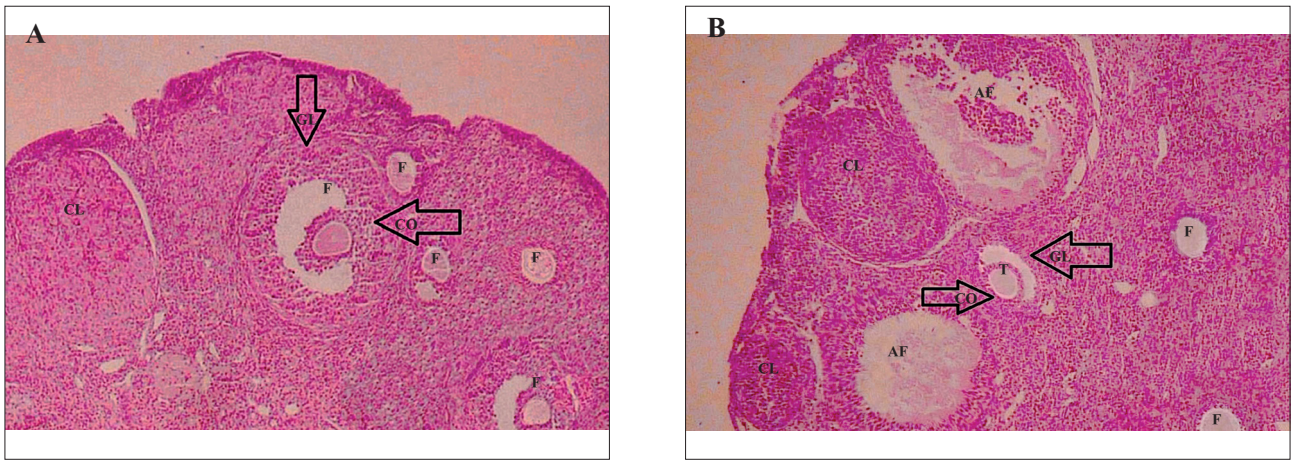
نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان می‌دهد که در میانگین بیشترین و کمترین طول فضای حفره رحم، میانگین قطر لایه اندومتریم رحم و میانگین قطر لایه میومتریوم رحم موش‌های گروه‌های آزمایشی نسبت به هم و همچنین در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (p>۰/۰۵، جدول ۱). علاوه بر این نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین طول و عرض سلول‌های پوششی رحم و میانگین طول و عرض هسته‌ی سلول‌های پوششی رحم در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد هیچ تفاوت معنی‌داری پیدا نکرده‌اند (p>۰/۰۵، جدول ۱).

بحث

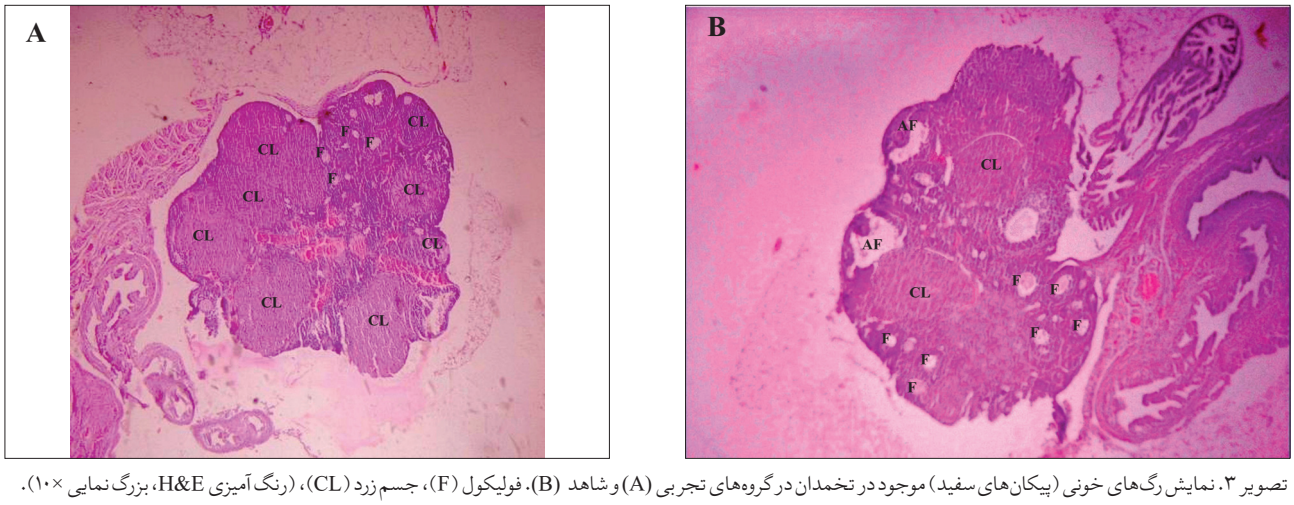
قدمت استفاده از گیاهان دارویی به قدمت تاریخ بشر است، هرچند که امروزه با پیشرفت علم از یک سو و مسائل اقتصادی از سوی دیگر از مصرف گیاهان دارویی کاسته شده و داروهای شیمیایی در بسیاری موارد جایگزین آنها شده‌اند. تجربه چند دهه اخیر نشان می‌دهد که داروهای شیمیایی با تمام کارآیی، اثرات نامطلوب و ناگوار بسیاری به همراه دارند. امروزه ثابت شده است که کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثرات سوء نباشد، لذا لزوم بررسی اصولی و واقع بینانه طب سنتی و گیاهان دارویی از مدت‌ها قبل در جوامع علمی احساس گردیده و در سال‌های اخیر به ضرورت



تصویر ۱. نمایش فولیکول‌های ثانویه، بالغ و تحلیل‌یافته در گروه‌های تجربی (A) و شاهد (B). فولیکول (F)، فولیکول ثانویه (SF)، فولیکول بالغ یا گراف (GF)، فولیکول تحلیل‌یافته (AF)، جسم زرد (CL)، (رنگ آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ×۴۰).



تصویر ۲. تفاوت در قطر اووسیت‌ها و اجسام زرد و در ضخامت لایه‌های گرانولوزا و کومولوس اووفروس موجود در تخمدان در گروه‌های تجربی (A) و شاهد (B). فولیکول (F)، لایه‌ی گرانولوزا (GL)، لایه‌کومولوس اووفروس (CO)، جسم زرد (CL)، (رنگ آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ×۴۰).



تصویر ۳. نمایش رگ‌های خونی (پیکان‌های سفید) موجود در تخمدان در گروه‌های تجربی (A) و شاهد (B). فولیکول (F)، جسم زرد (CL)، (رنگ آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ×۱۰).

بررسی اثرات گیاهان دارویی توجه بسیاری شده است. نتیجه این بررسی‌ها نشان داده که بسیاری از این گیاهان از جمله گلرنگ اثرات قابل توجهی در درمان بسیاری از بیماریها دارند (۱۶).

براساس پژوهش‌های تجربی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است، مشخص گردیده که گیاه گلرنگ می‌تواند عامل تغییر دهنده پتانسیل تولید مثل در جنس نر باشد، فعالیت‌های تولید مثلی را تغییر دهد

و نیز بر عملکرد اندوکراین بیضه‌ها مؤثر باشد (۱۳). هرچند گزارشاتی در مورد تأثیر گلرنگ بر سیستم تولید مثل در جنس نر وجود دارد، مطالعات اندکی در مورد تأثیر آن بر جنس ماده موجود است. از آنجا که بخش‌های مختلف سیستم تولید مثلی جنس ماده حساسیت‌های متفاوتی نسبت به انواع گوناگونی از مواد و داروها دارند، بنابراین برای بررسی تأثیر یک ماده بر تولید مثل جنس ماده، می‌توان شاخص‌های متفاوتی را مد نظر قرار داد تا بتوان نتیجه گرفت که این ماده در صورت تأثیر، بر کدام جایگاه اثر خود را بروز می‌دهد. به همین دلیل در مطالعه حاضر اثرات عصاره آبی گلرنگ بر ساختار هیستومورفومتری تخمدان و رحم مورد ارزیابی قرار گرفت.

گلرنگ با دارا بودن ترکیبات فراوان و متفاوت، می‌تواند اثرات زیادی را از خود نشان دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده آن است که عصاره آبی این گیاه می‌تواند منجر به افزایش وزن تخمدان‌ها شود. با توجه به تحقیق مشابه‌ای که اثر این گیاه را بر روی وزن بیضه‌ها در جنس نر بررسی کرده است (۱۳). در این مطالعه نیز می‌توان افزایش وزن تخمدان را به علت وجود مواد مختلف موجود در گلرنگ از جمله اسیدهای چربی مانند اسید لینولئیک و همچنین مواد معدنی مهمی مثل روی دانست. علاوه بر این در مطالعه حاضر تعداد فولیکول‌های ثانویه، گراف و جسم زرد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است که این خود شاید دلیلی برای افزایش وزن تخمدان‌ها در این گروه‌ها باشد. تحقیقات قبلی نشان داده است که اسید لینولئیک غلظت پروستاگلاندین‌ها و آدنوزین مونوفسفات حلقوی درون سلولی و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز را در طول تکامل افزایش می‌دهد. مسیرهایی که به واسطه آنها اسیدهای چرب از جمله اسید لینولئیک باعث افزایش عملکرد تولیدمثلی می‌شوند عبارتند از: الف) اسیدهای چرب باعث بهبود موازنه منفی انرژی می‌شوند که در نتیجه باعث افزایش فعالیت تخمدان‌ها و در نتیجه بروز فحلی می‌شود. ب) اسیدهای چرب باعث تحریک فولیکول‌سازی از نظر تعداد و یا اندازه و یا افزایش رشد فولیکول بالغ می‌شوند (۱۴)

رنگدانه‌های زرد و قرمز گلرنگ و همچنین ترکیب گرده موجود در آن دارای مقادیر قابل توجهی از فلزروی می‌باشند (۱۱). وجود عنصر روی برای انجام فعالیت طبیعی تولید مثل بسیار ضروری است. هرچند روی یک ماده معدنی ساده است اما حدود ۳۰۰ آنزیم مختلف در بدن، به طور مستقیم و غیر مستقیم با آن در ارتباط می‌باشند. روی بیشتر در تقسیمات سلولی نقش دارد؛ علاوه بر آن در تنظیم تعادل بین استروژن و پروژسترون در بدن نقش دارد و به این روش باعث سرعت بخشیدن به روند ساخت فولیکول‌ها می‌شود. این ماده همچنین سبب سریع شدن روند تولید مایع فولیکولی و حفظ سطح آن می‌شود (۹).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده آن است که عصاره آبی گلرنگ منجر به تغییر در ساختار هیستومورفومتری تخمدان در موش‌ها می‌شود، از جمله این تغییرات می‌توان به افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه، بالغ و کاهش تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته اشاره کرد. نتایج پژوهش حاضر همچنین نشان می‌دهد که عصاره آبی گلرنگ در هر دو غلظت موجب افزایش تعداد و قطر جسم زردهای موجود در تخمدان‌های موش‌های گروه‌های تجربی می‌شود ($p>0/05$).

یکی از دلایل افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه و بالغ در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد و کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوز موجود در گلرنگ است و از این نظر این گیاه یکی از بهترین داروهای گیاهی می‌باشد (۲۲). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی اثرات سافلاور زرد بر سیستم اعصاب مرکزی موش‌های صحرایی اعلام کردند که این ماده اثر عمده‌ای بر جلوگیری از آسیب مغزی ناشی از کاهش اکسیژن‌رسانی به بافت مغز، بعد از برقراری دوباره جریان خون داشته است. آنها بیان کردند که سافلاور زرد با کاهش میزان ماده مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) و افزایش میزان سوپراکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismutase) و گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase)، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد (۲۱).

پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که اسیدهای چرب موجود در گلرنگ می‌توانند به طور غیر مستقیم سبب افزایش تخمک‌گذاری شوند (۸). در این صورت افزایش تعداد جسم زرد در گروه‌های تجربی تیمار شده با گلرنگ قابل توجیه است. همچنین افزایش تعداد جسم زرد را با افزایش میزان پروژسترون می‌توان در ارتباط دانست. در همین راستا افزایش قطر جسم زرد در گروه‌های تجربی در تحقیق حاضر نیز توجیه پذیر است.

برخی از اسیدهای چرب موجود در گلرنگ از جمله گامالینولنیک اسید می‌توانند در بدن به دی‌هموگامالینولنیک اسید (Dihomogamma Linolenic Acid) و سپس به آراشیدونیک اسید تبدیل شوند که خود پیش‌ساز انواع پروستاگلاندین‌ها از جمله PGE2 است. پژوهش‌های انجام شده نشان داده است که PGE2 دارای اثرات تولید مثلی گسترده‌ای به ویژه بر روی بافت تخمدان می‌باشد.

El-Nefiawy و همکاران در سال ۲۰۰۵ با بررسی اثر انواع PGE2 از جمله EP4، EP3، EP2 بر فاکتورهای رشد فولیکولی در موش‌های صحرایی ماده اعلام کردند که EP2 و EP4 باعث افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌ها و همچنین افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد می‌شوند (۵).

Espey نیز در سال ۱۹۹۴ اعلام کرد که پروستاگلاندین‌ها می‌توانند سبب افزایش پارگی فولیکول‌ها و در نتیجه افزایش تخمک‌گذاری از طریق ایجاد انقباض در ساختار فولیکول شوند (۸). بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که PGE2 در مرحله نهایی تمایز فولیکولی در تخمدان مؤثر است (۱۵).

Tsujii و Dubois در سال ۱۹۹۵ با بررسی آنزیم سیکلواکسیژناز۲ (Cyclooxygnase2) که باعث تبدیل آراشیدونیک اسید به PGE2

می‌شود، اعلام کردند که PGE2 در فرآیند میتوز سلولی و حفاظت سلولی نقش عمده‌ای دارد. لازم به توضیح است که هر دو این عوامل در فرآیند رشد فولیکولی و بلوغ آن لازم و ضروری می‌باشند (۲۰).

تحقیقات Segi و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که آراشیدونیک اسید و متابولیت آن PGE2 تولید آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) را افزایش می‌دهند که این باعث افزایش سرعت شکسته شدن زنجیره جانبی کلسترول و تحریک تولید پروژسترون در مرحله تخمک‌گذاری و حفظ جسم زرد در انتهای مرحله تولید فولیکولی می‌شود (۱۹).

در تحقیق Reddy و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی تأثیر آراشیدونیک اسید و پروستاگلاندین‌ها در تکامل بافت تخمدانی و میزان مصرف آراشیدونیک اسید توسط بافت‌های مختلف مشاهده شد که میزان مصرف آراشیدونیک اسید در بافت تخمدان به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به سایر بافت‌های بدن از جمله سلول‌های کبدی، سلول‌های پوستی و... بیشتر بوده و میزان استفاده و ساخت پروستاگلاندین‌ها به طور معنی‌داری در ارتباط با بلوغ فولیکول‌ها می‌باشد. آنها با تزریق PGE2 در گروه‌های مورد آزمایش و بررسی فاکتورهای رشد فولیکولی اعلام کردند که رشد فولیکول‌های تخمدان به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر میزان PGE2 می‌باشد (۱۸).

یکی دیگر از اسیدهای چرب گلرنگ آلفالینولنیک اسید می‌باشد. گزارش شده است که آلفالینولنیک اسید می‌تواند به ایکوزانوئیدهای (Eicosanoids) گوناگون تبدیل شود. ایکوزانوئیدها در تولید استروئید دخالت دارند به طوری که مصرف ناکافی آلفالینولنیک اسید و در نتیجه تولید ناکافی ایکوزانوئیدها می‌تواند منجر به نازایی شود (۷)

دلیل دیگری که برای توجیه بهتر بودن روند تولید فولیکول در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد در مطالعه حاضر می‌توان ارائه کرد افزایش خونرسانی دستگاه تناسلی به دلیل مصرف گلرنگ است. در همین راستا Chen و همکاران در سال ۲۰۰۰ با بررسی اثر سافلاور زرد بر روی خون خرگوش و اندازه‌گیری فاکتور چسبندگی پلاکت‌های خونی (Platelet Adhesion Factor) و مشاهده کاهش معنی‌دار این فاکتور در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد بیان داشتند که سافلاور زرد تأثیرات ضد انعقادی داشته و باعث افزایش و بهبود گردش خون بافتی شده و از تجمع پلاکتی جلوگیری می‌کند (۲).

Zhang و Jiang نیز در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که تزریق داخل وریدی سافلاور زرد خالص در موش‌های آزمایشگاهی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی فعالیت‌های قلبی از طریق بهتر کردن ضربان قلب داشته که این تأثیر مثبت ناشی از افزایش میزان خون عروق کرونر و خون ورودی به قلب و تقویت بیان ژن bcl-2 (ژن آنتی آپوپتتیک) می‌باشد (۲۴). تأثیرات ماده مؤثره گلرنگ بر بیماریهای دستگاه گردش خون و مغزی به حدی است که سازمان دارویی آمریکا (FDA) استفاده از داروی سافلاور زرد را با دز ۳۵ mg/kg به صورت تزریقی تأیید کرده است (۳).

در مورد فولیکول‌های اولیه هر چند افزایش کمی در تعداد و قطر آنها در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ولی این افزایش تنها در تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه تجربی دریافت کننده گلرنگ به میزان ۸۰mg/kg معنی‌دار بود($p<۰/۰۵$). شاید بتوان این نتیجه را با کار Reddy و همکاران در سال ۲۰۰۴ مقایسه کرد. آنها اعلام کردند که با شروع مرحله پیش آنترالی و آنترالی میزان رشد فولیکول‌ها به طور عمده‌ای تحت تأثیر اسید آراشیدونیک (پیش ساز PGE2) قرار می‌گیرد که این رشد بستگی به میزان سلول‌های گرانولوزای فولیکول (که هم ترشح کننده PGE2 هستند هم دارای گیرنده‌های PGE2 در سطح خود می‌باشند) و همچنین مرحله بلوغ آن فولیکول (پیش آنترالی، آنترالی و گراف) دارد و از آنجایی که در مرحله اولیه، سلول دارای میزان کمی سلول گرانولوز و فضای آنترالی است میزان تأثیر آراشیدونیک بر فولیکول‌های اولیه معنی‌دار نبوده و افزایش اندک در تعداد این فولیکول‌ها بیشتر ناشی از افزایش خونرسانی و بهبود کلی خونرسانی به بافت تخمدان بوده است(۱۸).

با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی سافلاور زرد و حتی تقویت ژن‌های ضد آپوپتوز مانند ژن bcl-2 در بدن، انتظار می‌رفت که از میزان فولیکول‌های تحلیل یافته کاسته شود که نتایج به دست آمده هم بیانگر این مطلب است (۲۴). در مطالعه حاضر در تخمدان موش‌های گروه‌های تجربی، متوسط قطر لایه گرانولوزا و کومولوس اووفروس نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است و نسبت به گروه شاهد، سلول‌های این لایه از نظم و به هم پیوستگی خاصی برخوردار هستند. این مسئله منجر به عملکرد بهتر این سلول‌ها در تغذیه و حمایت از اووسیت شده و باعث افزایش قطر اووسیت نسبت به گروه شاهد می‌شود.

یکی از موارد استفاده از گلرنگ در طب سنتی درمان اختلالات قاعدگی و جنسی است (۲۳). این موضوع را یافته‌های موجود در تحقیق حاضر تأیید می‌کند زیرا یکی از منابع ترشح استروژن، سلول‌های گرانولوزا می‌باشد که انسجام و به هم پیوستگی این سلول‌ها در گروه‌های تجربی بیانگر این مطلب است.

در مطالعه حاضر مطابق پژوهش Lewis و Berardinelli در سال ۲۰۰۱ جهت بررسی تأثیر عصاره گلرنگ بر ساختار هیستومورفومتری رحم، پارامترهایی از جمله بیشترین و کمترین قطر فضای لومن، میانگین قطر لایه‌های اندومتریوم و میومتریوم، میانگین طول و عرض سلول‌های بافت پوششی رحم و میانگین طول و عرض هسته این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این پارامترها، پارامترهای اصلی برای ارزیابی تغییرات هیستومورفومتری رحم می‌باشند (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هیچ یک از پارامترهای اندازه‌گیری شده در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشته‌اند.

به نظر می‌رسد تأثیر اصلی عصاره گلرنگ با غلظت‌های مورد استفاده در این بررسی در مقایسه با رحم بیشتر بر روی تخمدان بوده است و شاید

تغییرات جزئی مشاهده شده در این پارامترها به علت افزایش خونرسانی به بافت رحم باشد که ناشی از ویژگی افزایش دهندگی خونرسانی بافتی این عصاره می باشد.

در مطالعه حاضر عصاره آبی گلرنگ تأثیر معنی داری بر وزن موش ها در گروه های تجربی در مقایسه با گروه شاهد نداشته است. انتظار می رفت که اسید لینولئیک موجود در گلرنگ روی وزن تأثیرگذار باشد. در مورد تأثیر اسید لینولئیک بر روی وزن، پژوهش های زیادی انجام و مقالات مختلفی منتشر شده است. در بسیاری از مقالاتی که بر روی حیوانات مختلف انجام شده است، بیان شده که استفاده از اسید لینولئیک مزدوج باعث تغییر در توده بدنی از طریق کاهش در میزان چربی بدن و افزایش در وزن استخوان ها، ماهیچه ها و ارگان های بدن شود (۱۷). شاید تفاوت میزان اسید لینولئیک مصرفی و مدت زمان دوره ی آزمایشی در پژوهش حاضر در مقایسه با دیگر گزارشات علت اصلی عدم تطابق نتایج بدست آمده بر روی وزن موش ها بوده است.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر می توان نتیجه گیری کرد که عصاره آبی گلرنگ تأثیرات مثبتی بر دستگاه تناسلی موش ماده دارد و این تغییرات را بیشتر از طریق تخمدان و بهبود روند تولید فولیکول ایجاد می کند. به نظر می رسد که عصاره آبی گلرنگ در غلظت های مورد استفاده کمترین تغییرات بافتی را در رحم ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اجرا شده است که بدینوسیله محققین مراتب تشکر و سپاس خود را اعلام می دارند.

References

1. Babpour, E., Angaji, A., Angaji, M. (2009) Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. J Med Plants Res. 3: 132-137.
2. Chen, W.M., Jin, M., Wu, W. (2000) Inhibition of safflor yellow on rabbit platelet activation induced by platelet activating factor. Chin Pharm J. 35: 741-744.
3. Chu, D., Liu, W., Huang, Z., Liu, S., Fu, X., Liu, K. (2006) Pharmacokinetics and excretion of hydroxysafflor yellowA, a potent neuroprotective agent from safflower, in rats and dogs. Planta Med. 72: 418-423.
4. Ekin, Z. (2005) Resurgence of safflower (*Carthamustinctorius L*) utilization: A global view. J Agron. 4: 83-87.
5. El-Nefiawy, N., Abdel-Hakim, K., Kanayama, N. Terao, T. (2005) Role of prostaglandin E2 receptor subtypes in ovarian follicle growth in the rat in vivo. Correlation with interleukin-8 and neutrophils. Histol Histopathol. 20: 825-831.
6. Emongor, V. (2010) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) the underutilized and neglected crop: A review. Asian J Plant Sci. 9: 299-306.
7. Eritsland, J. (2000) Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. J Clin Nutr. 71: 197S-201S.
8. Espey, L.L. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biol Reprod. 50: 233-8.
9. Lamberti, L.M., Walker, C.L., Chan, K.Y., Jian, W.Y., Black, R.E. (2013) Oral zinc supplementation for the treatment of acute diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis. Nutrients. 21: 4715-4740.
10. Lewis, A.W., Berardinelli, J.G. (2001) Gross anatomical and histomorphometric characteristics of the oviduct and uterus during the pubertal transition in sheep. J Anim Sci. 79: 167-175.
11. Li, Y., Che, Q. (1998) Studies on chemical components of carthamustinctorius petals. Acta Pharm Sin. 33: 626-628.
12. Louei Monfared, A., Salati, A.P. (2013) Effects of *Carthamus tinctorius L*. on the ovarian histomorphology and the female reproductive hormones in mice. AJP. 3: 171-177.
13. Modaresi, M. (2005) Effect of safflower (*Carthamus Tinctorius L*) alcoholic extract on hormone pituitary-gonadal axis and testis histology in mice. Zanjan Uni Med Sci J. 13: 1-7.
14. Modaresi, M., Poor-Naji, N. (2012) The effect of black seed (*Nigella sativa*) hydro-alcoholic extract on breeding factors in female mice. J Shahrekord Univ Med Sci. 13: 63-70.
15. Nuttinck, F., Reinaud, P., Tricoire, H., Vigneron, C., Peynot, N., Mialot, J.P., Mermillod, P., Charpigny, G. (2002) Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. Mol Reprod Dev. 61: 93-101.
16. Omidbaigi, R. (2005) Production and Processing of Medical plants. (1st ed.) Astan Ghods Razavi Press,

Mashhad, Iran.

17. Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999) Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. Lipids. 34: 235-241.
18. Reddy, P.S., Reddy, P.R., Nagaraju, G.P.C. (2004) The synthesis and effects of prostaglandins on the ovary of the crab *Oziotelphusa senex*. Gen Comp Endocrinol. 135: 35-41.
19. Segi, E., Haraguchi, K., Sugimoto, Y., Tsuji, M., Tsunekawa, H., Tamba, S., Tsuboi, K., Tanaka, S., Ichikawa, A. (2003) Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozyme in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. Boil Reprod. 68: 804-811.
20. Tsujii, M., Dubois, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide sythase. Cell. 83: 493-501.
21. Wang, C., Ma, H., Zhang, S., Wang, Y., Liu, J., Xiao, X. (2009) Safflor yellow B suppresses pheochromocytoma cell (PC12) injury induced by oxidative stress via antioxidant system and Bcl-2/Bax pathway. N-S Arch Pharmacol. 380: 135-142.
22. Wang, C., Zhang, D., Li, G., Liu, J., Tian, J., Fu, F., Liu, K. (2007) Neuroprotective effects of safflor yellow B on brain ischemic injury. Exp Brain Res. 177: 533-539.
23. Weiss, E.A. (1983) Oilseed Crops. (1st ed.) Longman Group Limited. London, UK.
24. Zhang, S.Q., Jiang, L.D. (2004) Effect of safflower injection on cardiac energy charge and anti-apoptosis gene bcl-2 in rats heart. Chin J Integr Tradit West Med. 24: 442-446.
25. Zhao, M., Ito, Y., Tu, P. (2005) Isolation of a novel flavanone 6-glucoside from the flowers of Carthamustinctorium (Honghua) by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A 1090: 193-196.

The effects of safflower (*Carthamus tinctorius L*) aqueous extract on reproductive system of mice

Habibian Dehkordi, S.[1*], Shadkhast, M.[2], Shateri, M.H.[3], Kaboutari, J.[1], Mirshokraee, P.[4]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran*

[2]*Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran*

[3]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran*

[4]*Department of Obstetrics and Reproductive Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran*

(Received 3 September 2013, Accepted 26 November 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Safflower is one of those herbal medicines that many studies rely on its use for the treatment of menstrual problems and diseases of the circulatory system. The flowers of this plant have long been used as a sexual stimulant medication. Furthermore there is evidence about its effects on the infertility and sexual disorders. **OBJECTIVES:** Considering the effect of this plant on infertility, this study was designed to investigate the role of the aqueous extract of Safflower on the histomorphometric structure of female genital system in mice. **METHODS:** 30 female balb/c mice were randomly divided into 3 equal groups. In group one, Safflower extract was given orally for 45 consecutive days at the dose of 40mg/kg. Safflower extract (80 mg/kg) was given orally to mice in group two for 45 days. Mice in group three (Control group) received water in the same volume, way and time. Results from present study were analyzed statistically using ANOVA and Tukey's test. **RESULTS:** The results showed that long term use of Safflower extract increased ovarian weight of mice (group one: 0.8±0.04, group two: 1.1±0.07) compared to control group (0.4±0.06), significantly ($p<0.05$). Histomorphological studies revealed that use of Safflower increased the number and diameter of secondary follicles (group one: 3±0.57; 9±0.66, group two: 3.25±0.25; 9.08±0.3), graafian follicles (group one: 1.1±0.17; 7.66±0.54, group two: 1.2±0.13; 8±0.75) and corpus luteum (group one: 4.75±0.75; 5.27±0.29, group two: 4.75±0.47; 5.4±0.31) significantly ($p<0.05$). However, the number of atretic follicles were decreased in experimental groups (group one: 2.5±0.0.28, group two: 2.25±0.62) significantly ($p<0.05$). Furthermore, the diameter of granulosa layer (group one: 4.58±0.3, group two: 3.25±0. 3) and colosum oophorus (group one: 2.5±0.18, group two: 2.58±0. 15) in experimental groups were changed compared to control group (4.66±0.33, 1.87±0.15,) significantly ($p<0.05$). Safflower had no significant effects on the histomorphological structure of uterus ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** It can be concluded that the aqueous extract of Safflower is more effective on ovaries compared to uterus and may have positive effects on fertility in female mice.

Key words: reproductive system, Safflower, histomorphology, mice

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean ± SE of measured parameters in the experimental and control groups. (*) In each row difference is significant ($p<0.05$).

Figure 1. Demonstration of secondary follicles, Graafian follicles and atretic follicles in the (A) experimental groups, (B) control. Follicles (F), Secondary Follicles (SF), Graafian Follicles (GF), Atretic Follicles (AF), Corpous Luteum (CL), (H&E Staining, Magnification x10).

Figure 2. Difference in the diameters of oocytes and corpous luteums, and in the thichness of granulosa and Cumulus Oophorus layers in the ovary of the (A) experimental groups, (B) Control. Follicles (F), Secondary Follicles (SF), Graafian Follicles (GF), Atretic Follicles (AF), Corpous Luteum (CL), (H&E Staining, Magnification x10).

Figure 3. Demonstration of blood vessels (white arrows) in the Ovary of the (A) experimental group, (B) Control. Follicles (F), Corpous Luteum (CL), (H&E Staining, Magnification x10).

***Corresponding author's email: habibian@vet.sku.ac.ir, Tel: 0381-4424401-6, Fax: 0381-4424427**