

Evaluation of the effects of Anthocyanins on hormonal factors and histological changes of the ovary in rats treated with Cyclophosphamide

Farideh Akbari¹ , Sevil Ghafarzadeh Rad^{2*} , Razieh Vejdani³ , Shabnam Yaghoubi Kondelaji⁴ 

¹Department of Oncology and Hematology, Shahid Ghazi Hospital, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Endocrine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Obstetrics and Gynecology, Shahid Beheshti Hospital, Faculty of Medicine, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Alzahra Hospital, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 7 Jun 2026

Revised: 25 Jul 2026

Accepted: 27 Jul 2026

ePublished: 19 Sep 2026

Keywords:

- Cyclophosphamide
- Ovary
- Chemotherapy
- Hormones
- Anthocyanin

Abstract

Background. Cyclophosphamide, a common chemotherapeutic drug, induces premature ovarian failure and infertility due to oxidative stress and apoptosis. This study aimed to investigate the protective effect of anthocyanins, as natural antioxidant and anti-inflammatory compounds, on hormonal factors and histological changes of the ovary against cyclophosphamide.

Methods. A total of 32 female Wistar rats were selected and randomly divided into four groups: (1) healthy control group, (2) cyclophosphamide-injured group (200 mg/kg), (3) therapeutic group receiving cyclophosphamide along with anthocyanins at a dose of 100 mg/kg for 28 days, and (4) healthy group receiving anthocyanins. At the end of the treatment, serum levels of estradiol, progesterone, Anti-Müllerian Hormone (AMH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), and Luteinizing Hormone (LH) were measured by ELISA. Ovaries were examined for histopathological and histomorphometric evaluation (follicle count and fibrosis percentage).

Results. Cyclophosphamide caused a significant decrease in ovarian weight, as well as estradiol, progesterone, and AMH levels, and an increase in FSH and LH levels ($P < 0.05$). Tissue damage included a severe reduction in healthy follicles, increased atresia, and stromal fibrosis. Concurrent administration of anthocyanins, especially at the dose of 100 mg/kg, reversed these changes in a dose-dependent manner and significantly restored hormonal and tissue parameters to levels close to the control group.

Conclusion. Anthocyanins, through antioxidant and anti-inflammatory mechanisms, prevent hormonal dysfunction and structural ovarian damage induced by cyclophosphamide. These compounds show high potential as natural protective agents for ovarian reserve during chemotherapy.

Practical Implications. Anthocyanins, with their antioxidant and anti-inflammatory properties, can effectively prevent the hormonal disruption and structural damage to the ovaries caused by the administration of cyclophosphamide.

How to cite this article: Akbari F, Ghafarzadeh Rad S, Vejdani R, Yaghoubi Kondelaji Sh. Evaluation of the effects of Anthocyanins on hormonal factors and histological changes of the ovary in rats treated with Cyclophosphamide. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(4):370-380. doi: 10.34172/mj.026.35314. Persian.

*Corresponding author; Email: drsgrad84@gmail.com

© 2026 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.

Extended Abstract

Background

Cyclophosphamide is an alkylating chemotherapy drug, which is widely used in the treatment of a variety of malignancies and autoimmune diseases. Despite its high efficacy, its use is associated with significant side effects, one of the most concerning of which is toxicity to the reproductive system, especially in women. Cyclophosphamide can cause ovarian dysfunction, follicular reserve depletion, premature ovarian insufficiency (POI), and infertility by inducing oxidative stress, apoptosis, and DNA damage. These damages are often accompanied by adverse changes in sex hormone levels (e.g., estradiol, progesterone, anti-Müllerian hormone (AMH), and follicle-stimulating hormone (FSH)) as well as the occurrence of specific histological alterations such as follicular atresia, stromal fibrosis, and decreased corpora lutea. Consequently, finding protective strategies to reduce these complications has become a necessity in the field of reproductive medicine. This study aimed to investigate the protective effect of anthocyanins, as natural antioxidant and anti-inflammatory compounds, on hormonal factors and histological changes of the ovary against cyclophosphamide.

Methods

This experimental study was conducted on 32 adult female Wistar rats (age of 8 weeks, weight of 180–200 g). After one week of acclimation under standard conditions (temperature of $22\pm1^{\circ}\text{C}$, photoperiod of 12/12 hours, humidity of 50–55%, and free access to food and water), the animals were randomly divided into four groups (8 animals per group): (1) healthy control (receiving vehicle solution for 28 days), (2) cyclophosphamide (intraperitoneal injection of cyclophosphamide at a dose of 200 mg/kg on days 1 and 8), (3) cyclophosphamide + anthocyanin (receiving cyclophosphamide similar to group 2 along with anthocyanin 100 mg/kg/day by gavage for 28 days), and (4) anthocyanin (receiving anthocyanin 100 mg/kg/day). All procedures were performed according to the SAGER guidelines. Additionally, the research protocol was approved by the Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences

(IR.TBZMED.AEC.1403.061). At the end of the experimental period, animals were anesthetized with ketamine/xylazine and underwent cardiac blood sampling. Finally, both ovaries were removed. Blood serum was analyzed for estradiol, progesterone, FSH, LH, and AMH levels using ELISA kits (Monobind, USA). Ovarian tissues were fixed in 10% formalin, processed, embedded in paraffin, cut into 5-micron sections, and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Histopathological studies included examination of ovarian morphology, counting of primary, secondary, antral, and corpus luteum follicles, and assessment of atresia, necrosis, and hemorrhage. Moreover, histomorphometric analysis was performed using ImageJ software to count follicles and measure the thickness of the granulosa layer. Data were analyzed using SPSS version 26. Normality of data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test, and group comparisons were performed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test. Results are reported as mean $\pm$ standard deviation, and $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

At the end of the 28-day period, the injection of cyclophosphamide significantly reduced the final body weight and relative ovarian weight compared to the control group ($P<0.05$). Simultaneous administration of anthocyanin significantly compensated for this decrease and brought the body weight and relative ovarian weight values to levels close to the control group, while anthocyanin alone had no adverse effect on these indices.

The evaluation of the hormonal profile showed that cyclophosphamide significantly reduced serum levels of estradiol, progesterone, and anti-müllerian hormone (AMH) and significantly increased FSH and LH levels compared to the control group ($P<0.05$). Treatment with anthocyanin significantly corrected these abnormalities; in other words, estradiol, progesterone, and AMH levels increased and FSH and LH values decreased compared to the cyclophosphamide group ($P<0.05$). In the group

receiving anthocyanin alone, hormonal values similar to those of the control group were observed.

Histopathological examination of hematoxylin-eosin stained sections showed that the ovarian structure in the control group was normal and follicles were observed at different stages of development along with healthy corpus luteum. In contrast, the cyclophosphamide group suffered from significant tissue damage including a decrease in the number of primary, secondary, and antral follicles, an increase in atretic follicles, a decrease in the number and quality of corpus luteum, detachment of the granulosa layer, and areas of hemorrhage. Treatment with anthocyanin significantly reduced these pathological changes and improved the ovarian tissue architecture and increased the number of healthy follicles, while the ovarian tissue in the anthocyanin alone group was similar to the control group.

The results of histomorphometric analysis also confirmed the histopathological findings. Cyclophosphamide significantly reduced the number of primary and antral follicles, decreased the number of corpora lutea, and significantly increased the number of atretic follicles ($P<0.05$). In addition, the average thickness of the granulosa layer in antral

follicles was significantly reduced. The administration of anthocyanin significantly corrected these changes; in other words, the number of healthy follicles and corpora lutea increased, the number of atretic follicles decreased, and the thickness of the granulosa layer significantly improved compared to the cyclophosphamide group ($P<0.05$). These findings indicate that anthocyanin has a significant protective effect against cyclophosphamide-induced ovarian damage and preserves ovarian structure and function.

Conclusion

Anthocyanins, through antioxidant and anti-inflammatory mechanisms, prevent hormonal dysfunction and structural ovarian damage induced by cyclophosphamide. These compounds show high potential as natural protective agents for ovarian reserve during chemotherapy.

Practical Implication

Anthocyanins, with their antioxidant and anti-inflammatory properties, can effectively prevent the hormonal disruption and structural damage to the ovaries caused by the administration of cyclophosphamide.

بررسی اثرات آنتوسیانین بر فاکتورهای هورمونی و تغییرات بافت‌شناسی تخمدان در موش‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید

فریده اکبری^۱، سویل غفارزاده راد^۲، راضیه وجدانی^۳، شبنم یعقوبی کندلاجی^۴

^۱ گروه اونکولوژی و هماتولوژی، بیمارستان شهید قاضی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲ مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ گروه زنان و مامایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران
^۴ گروه زنان و مامایی، بیمارستان الزهرا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه. سیکلوفسفامید، یک داروی شیمی‌درمانی رایج، به دلیل القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز، باعث نارسایی زودرس تخمدان و ناباروری می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر محافظتی آنتوسیانین، به‌عنوان ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب، بر فاکتورهای هورمونی و تغییرات بافت‌شناسی تخمدان در مواجهه با سیکلوفسفامید انجام شد.

روش کار. سی و دو سر موش صحرایی ماده ویستار به‌صورت تصادفی در ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل سالم، آسیب‌دیده با سیکلوفسفامید (۲۰۰mg/kg) و گروه درمانی که علاوه بر سیکلوفسفامید، آنتوسیانین را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز دریافت کردند و یک گروه سالم دریافت‌کننده آنتوسیانین. در پایان، سطوح هورمون‌های استرادیول، پروژسترون، هورمون آنتی‌مولرین (AMH)، هورمون محرک فولیکول (FSH) و هورمون لوتئینی (LH) با روش الایزا سنجش شد و تخمدان‌ها برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک و هیستومورفومتریک (شمارش فولیکول‌ها و درصد فیروز) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها. سیکلوفسفامید باعث کاهش معنی‌دار وزن تخمدان، سطح استرادیول، پروژسترون و AMH و افزایش FSH و LH شد ($P < 0.05$). آسیب بافتی شامل کاهش شدید فولیکول‌های سالم، افزایش آترزی و فیروز استرومایی بود. تجویز آنتوسیانین، این تغییرات را معکوس کرد و پارامترهای هورمونی و بافتی را به‌طور قابل‌توجهی به سطح گروه کنترل نزدیک نمود.

نتیجه‌گیری. آنتوسیانین‌ها با مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی از اختلال عملکرد هورمونی و آسیب‌های ساختاری تخمدان ناشی از سیکلوفسفامید جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات پتانسیل بالایی به‌عنوان عامل محافظت‌کننده طبیعی از ذخیره تخمدانی در طول شیمی‌درمانی دارند.

پیامدهای عملی. استفاده از آنتوسیانین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌تواند از اختلالات هورمونی و آسیب‌های بافتی تخمدان که به وسیله داروهای شیمی‌درمانی و سیکلوفسفامید ایجاد می‌شود جلوگیری کند و از آسیب به سیستم تولیدمثلی جلوگیری نماید.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷
اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۵/۳
پذیرش: ۱۴۰۵/۵/۵
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۶/۱۹

کلیدواژه‌ها:

- سیکلوفسفامید
- تخمدان
- شیمی‌درمانی
- هورمون
- آنتوسیانین

مقدمه

سیکلوفسفامید، یک داروی شیمی‌درمانی آلکیله‌کننده، به‌طور گسترده در درمان انواع بدخیمی‌ها و بیماری‌های خودایمنی به‌کار می‌رود.^۱ با وجود اثربخشی بالای این دارو، استفاده از آن با عوارض جانبی قابل‌توجهی همراه است که یکی از نگران‌کننده‌ترین آن‌ها، سمیت روی سیستم تولیدمثلی به‌ویژه در زنان است.^{۲،۳} سیکلوفسفامید با القای استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و آسیب DNA، می‌تواند باعث اختلال در عملکرد تخمدان، کاهش ذخیره

فولیکولی، ایجاد نارسایی زودرس تخمدان (POI) و ناباروری شود.^{۴،۵} این آسیب‌ها اغلب با تغییرات نامطلوب در سطوح هورمون‌های جنسی، مانند استرادیول، پروژسترون، هورمون آنتی‌مولرین (AMH) و هورمون محرک فولیکول (FSH) و همچنین بروز آلتراسیون‌های بافت‌شناختی مشخصی مانند آترزی فولیکول‌ها، فیروز استرومایی و کاهش تعداد جسم‌های زرد همراه هستند.^{۶،۷} در نتیجه، یافتن راهکارهای محافظتی برای کاهش این عوارض، به یک ضرورت در حوزه پزشکی تولیدمثلی تبدیل شده است.

*نویسنده مسؤول: drsgad84@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت 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.

دامپزشکی دانشگاه تبریز تهیه و به مدت یک هفته در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 1 درجه سانتی گراد، چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته، رطوبت ۵۰-۵۵ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد) با سازگاری محیطی نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل اخلاقی SAGER انجام شد. همچنین این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تأیید قرار گرفت (کد اخلاق: IR.TBZMED.AEC.1403.061).

پس از این دوره، حیوانات به طور تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی تقسیم بندی شدند: گروه ۱ (کنترل سالم): این گروه به مدت ۲۸ روز، روزانه محلول حامل (نرمال سالین یا آب مقطر) را به صورت گاوژ دریافت کردند. گروه ۲ (آسیب دیده با سیکلوفسفامید): این گروه برای القای سمیت تخمدانی، در روزهای اول و هشتم مطالعه، دوز منفرد 200 mg/kg سیکلوفسفامید (محلول در نرمال سالین) را به صورت داخل صفاقی (IP) دریافت کردند.^{۱۳} در روزهای باقی مانده، محلول حامل ارایه شد. گروه ۳ (درمانی با آنتوسیانین): حیوانات این گروه، دوز سیکلوفسفامید را مشابه گروه ۲ دریافت کردند. هم زمان، به مدت ۲۸ روز و یک ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامید (یا محلول حامل در روزهای بدون تزریق)، آنتوسیانین خالص شده با دوز 100 mg/kg/day به صورت گاوژ دریافت کردند.^{۱۴} گروه ۴ (آنتوسیانین): موش های سالم دریافت کننده آنتوسیانین mg/kg/day ۱۰۰ بودند.

مواد شیمیایی و دارویی مورد استفاده شامل سیکلوفسفامید (ویال ۵۰۰ میلی گرمی، ساخت شرکت BAXTER آلمان)، آنتوسیانین (تهیه شده از عصاره ترغال اخته یا سیانیدین-۳-گلوکوزید با خلوص بالای ۹۵٪، شرکت Sigma-Aldrich)، کیت های الیزا سنجش هورمون های استرادیول، پروژسترون، FSH، LH و AMH از شرکت Monobind آمریکا، محلول بافری فرمالین ۱۰ درصد برای فیکساسیون بافت تخمدان، رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی بودند که از مراجع معتبر تهیه شدند.

پس از پایان دوره ۲۸ روزه، حیوانات پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین/ایلازین بیهوش شده و خونگیری از قلب برای سنجش هورمونی انجام شد. سپس با تشریح ناحیه شکمی، هر دو تخمدان خارج شدند. بافت تخمدان، پس از شستشو با نرمال سالین و توزین، در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد.

سرم جدا شده از نمونه خون، با استفاده از روش الیزا و مطابق با دستورالعمل کیت های تجاری، برای اندازه گیری سطوح هورمون های استرادیول، پروژسترون، FSH، LH و AMH تهیه شده

در این میان، ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته اند. آنتوسیانین ها دسته ای از فلاونوئیدها هستند که به عنوان رنگ دانه های قرمز، بنفش و آبی در بسیاری از میوه ها (مانند توت سیاه، تمشک، گیلان، انگور قرمز) و سبزیجات یافت می شوند.^{۶، ۷} این ترکیبات پلی فنلی، به دلیل توانایی در خنثی سازی رادیکال های آزاد، تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی اندوژن (مانند افزایش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز)، تعدیل مسیرهای سیگنالینگ التهابی (مانند مهار فاکتور هسته ای کاپای NF- κ B) و مهار آپوپتوز، پتانسیل بالایی برای محافظت از بافت های مختلف در برابر سمیت ناشی از داروها از جمله سیکلوفسفامید دارند.^{۹، ۸}

بررسی این فرضیه که آنتوسیانین ها از طریق مکانیسم های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود می توانند به عنوان یک عامل کمپروتنکتیو (حافظت کننده در برابر شیمی درمانی) عمل کنند، از اهمیت بالینی قابل توجهی برخوردار است.^{۱۰، ۱۱} استفاده از این ترکیبات طبیعی کم عارضه (چه به شکل رژیم غذایی غنی و چه به- عنوان مکمل) می تواند راهکار مفیدی برای بهبود کیفیت زندگی بیماران تحت شیمی درمانی و حفظ پتانسیل باروری آنان باشد.^{۱۲} این تحقیق با رویکردی تجربی، با در نظر گرفتن گروه های کنترل، شاهد آسیب دیده با سیکلوفسفامید و گروه های درمانی با آنتوسیانین و با استفاده از سنجش شاخص های هورمونی و ارزیابی های هیستوپاتولوژیک و هیستومورفومتریک، به بررسی اثرات محافظتی آنتوسیانین بر آسیب تخمدانی ناشی از سیکلوفسفامید پرداخت. نتایج این مطالعه می تواند زمینه ساز انجام مطالعات آینده برای بررسی مکانیسم های مولکولی این اثرات باشد. هدف ما بررسی اثرات محافظتی آنتوسیانین ها بر فاکتورهای هورمونی و تغییرات بافت شناسی تخمدان در موش های مواجهه شده با سیکلوفسفامید بود. این مطالعه به دو سؤال اصلی پاسخ می دهد: (۱) آیا تجویز هم زمان آنتوسیانین ها می تواند از اختلالات هورمونی ناشی از سیکلوفسفامید (شامل تغییرات در سطوح استرادیول، پروژسترون، AMH، FSH و LH) جلوگیری یا آن را کاهش دهد؟ و (۲) آیا آنتوسیانین ها قادر به حفظ ساختار طبیعی بافت تخمدان، جلوگیری از آترزی فولیکول ها و کاهش فیروز استرومایی در مواجهه با این داروی شیمی درمانی هستند؟

روش کار

این مطالعه به صورت تجربی و بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار ماده بالغ (با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰ گرم و سن ۸ هفته) انجام شد. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده

از شرکت Monobind مورد استفاده قرار گرفت. خوانش جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر انجام و غلظت هورمون‌ها بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید.

بافت‌های تثبیت شده تخمدان، با استفاده از دستگاه اتوماتیک پردازش بافت، آب‌زدایی، شفاف‌سازی و در نهایت در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس از بافت‌های قالب‌گیری‌شده، مقاطع سریالی به ضخامت ۵ میکرون با میکروتوم تهیه و بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار داده شدند.

به‌منظور بررسی کلی مورفولوژی تخمدان، شمارش و طبقه‌بندی فولیکول‌های در حال رشد، اولیه، ثانویه، آنترال و جسم زرد و همچنین مشاهده علایمی مانند آترزی فولیکولی، نکروز و خونریزی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) استفاده شد و نمونه‌ها با این روش رنگ‌آمیزی شدند و بعد از چسباندن لامل مورد بررسی قرار گرفتند.

بر روی تصاویر میکروسکوپی دیجیتال تهیه شده با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ x و ۴۰۰ x، تحلیل‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ انجام شد. در این راستا، تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه و آنترال، همچنین جسم زرد، در هر مقطع شمارش و به‌ازای هر مقطع از بافت تخمدان گزارش شد. علاوه بر این، ضخامت لایه گرانولوزا در بزرگ‌ترین فولیکول آنترال هر تخمدان اندازه‌گیری و بین گروه‌های مختلف مقایسه شد.

کلیه داده‌های کمی، شامل داده‌های هورمونی و هیستومورفومتریک، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. برای مقایسه بین گروه‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارایه شدند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در پایان دوره ۲۸ روزه، وزن نهایی بدن و وزن نسبی تخمدان (بر حسب میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول ۱ و نمودار ۱ نشان داده شده است، تزریق سیکلوفسفامید در گروه دوم (آسیب‌دیده با سیکلوفسفامید) منجر به کاهش معنی‌داری در وزن نهایی بدن و وزن نسبی تخمدان‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم شد ($P > 0/05$). درمان هم‌زمان با آنتوسیانین، در گروه‌های دریافت‌کننده آنتوسیانین، این کاهش وزن را به‌طور قابل‌توجهی جبران کرده و وزن تخمدان را به

سطوح نزدیک به گروه کنترل در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید بازگرداند ($P > 0/05$).

تأثیر سیکلوفسفامید و آنتوسیانین بر پروفایل هورمونی در جدول ۲ خلاصه شده است.

- استرادیول و پروژسترون: سطوح این هورمون‌ها در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل به‌طور چشمگیری کاهش یافت ($P > 0/05$). درمان با آنتوسیانین این کاهش را به صورت معناداری تعدیل کرد، به طوری که در گروه درمانی با آنتوسیانین سطوح هورمونی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل سیکلوفسفامید نشان داد ($P > 0/05$).

- هورمون آنتی‌مولرین (AMH): به‌عنوان شاخص ذخیره فولیکولی، AMH در گروه سیکلوفسفامید نسبت به کنترل شدیداً کاهش یافت. آنتوسیانین در تمامی گروه‌ها باعث افزایش معنی‌دار AMH شد، طوری‌که نسبت به گروه سیکلوفسفامید این اثر معنادار بود ($P > 0/05$).

- گنادوتروپین‌ها (FSH و LH): سطوح FSH و LH در گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد که نشانه اختلال در فیدبک منفی تخمدان است ($P > 0/05$). تجویز آنتوسیانین در گروه‌های درمانی در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، این افزایش را به‌طور قابل‌توجهی سرکوب کرد ($P > 0/05$).

بررسی مقاطع رنگ‌آمیزی‌شده با هماتوکسیلین و ئوزین (H&E) در شکل ۱ (ضمیمه) نشان داد که ساختار تخمدان در گروه کنترل طبیعی بود و فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد، همراه با جسم‌های زرد سالم، مشاهده شدند. در گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید، علایم شدید آسیب بافتی شامل کاهش چشمگیر تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه و آنترال سالم، افزایش تعداد فولیکول‌های آترزیک (تحلیل‌رفته)، کاهش تعداد و کیفیت جسم‌های زرد، خونریزی و جداشتگی لایه گرانولوزا در فولیکول‌های باقی‌مانده مشاهده شد. درمان با آنتوسیانین موجب بهبود معنادار این تغییرات پاتولوژیک شد. در گروه سیکلوفسفامید + آنتوسیانین، ساختار تخمدان در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافت و نشانه‌هایی از ترمیم بافتی مشاهده شد. همچنین، در گروه سالم دریافت‌کننده آنتوسیانین، وضعیت بافت تخمدان مشابه گروه کنترل بود. تعداد فولیکول‌های سالم نیز به‌طور معناداری افزایش یافت (جدول ۳).

جدول ۱. مقایسه وزن نهایی بدن و وزن نسبی تخمدان در گروه‌های مختلف

گروه‌های آزمایشی	وزن نهایی بدن (Mean $\pm$ SD) (گرم)	وزن نسبی تخمدان (mg/100g BW) (Mean $\pm$ SD)
کنترل	۲۱۵/۶ $\pm$ ۵/۳	۴۰/۲ $\pm$ ۳/۱
سیکلو فسفامید	۱۷۵/۴ $\pm$ ۷/۱*	۲۲/۸ $\pm$ ۲/۷*
آنتوسیانین + سیکلو فسفامید	۱۹۵/۷ $\pm$ ۷/۵#	۲۹/۶ $\pm$ ۳/۰#
آنتوسیانین	۲۲۰/۲ $\pm$ ۶/۸	۴۲/۴ $\pm$ ۲/۵

 * اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P > ۰/۰۵$)

 # اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سیکلو فسفامید ($P > ۰/۰۵$)

جدول ۲. سطوح هورمونی سرم در گروه‌های مختلف آزمایشی

هورمون	کنترل	سیکلو فسفامید	آنتوسیانین + سیکلو فسفامید	آنتوسیانین
استرادیول (pg/ml)	۴۵/۶ $\pm$ ۵/۲	۱۳/۳ $\pm$ ۴/۱*	۲۴/۶ $\pm$ ۳/۸#	۴۵/۴ $\pm$ ۴/۹#
پروژسترون (ng/ml)	۳۲/۸ $\pm$ ۳/۷	۱۰/۵ $\pm$ ۲/۹*	۱۷/۴ $\pm$ ۳/۲#	۳۳/۳ $\pm$ ۳/۵#
AMH (ng/ml)	۴/۷ $\pm$ ۰/۶	۱/۱۵ $\pm$ ۰/۳*	۲/۴ $\pm$ ۰/۴#	۴/۹ $\pm$ ۰/۵#
FSH (mIU/ml)	۵/۱ $\pm$ ۰/۷	۱۲/۶ $\pm$ ۲/۱*	۹/۳ $\pm$ ۱/۸#	۴/۸ $\pm$ ۱/۲#
LH (mIU/ml)	۳/۸ $\pm$ ۰/۵	۱۵/۲ $\pm$ ۱/۴*	۸/۱ $\pm$ ۱/۱#	۳/۶ $\pm$ ۰/۸#

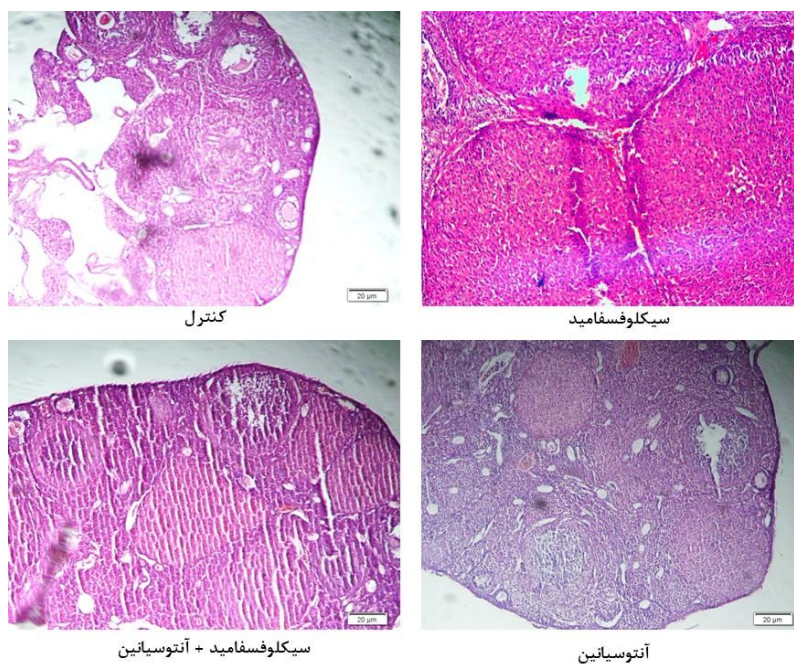
 * اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P > ۰/۰۵$)

 # اختلاف معنی‌دار با گروه سیکلو فسفامید ($P > ۰/۰۵$)

جدول ۳. نتایج شمارش فولیکولی و ارزیابی هیستومورفومتريک

پارامتر	کنترل	سیکلو فسفامید	سیکلو فسفامید + آنتوسیانین	آنتوسیانین
تعداد فولیکول اولیه	۲۵/۳ $\pm$ ۳/۲	۱۰/۱ $\pm$ ۲/۴*	۱۴/۶ $\pm$ ۲/۸#	۱۹/۸ $\pm$ ۳/۱
تعداد فولیکول آنترال	۱۲/۸ $\pm$ ۲/۱	۳/۵ $\pm$ ۱/۳*	۵/۹ $\pm$ ۱/۵#	۹/۲ $\pm$ ۱/۸
تعداد فولیکول‌های آنتریک	۸/۲ $\pm$ ۱/۵	۵۲/۷ $\pm$ ۶/۸*	۳۸/۴ $\pm$ ۵/۹#	۲۱/۳ $\pm$ ۴/۲
تعداد جسم زرد	۵/۴ $\pm$ ۱/۳	۱/۰۹ $\pm$ ۰/۱*	۳/۲ $\pm$ ۰/۳۲#	۵/۶ $\pm$ ۱/۰۵
قطر لایه گرانولوزا	۶۵/۴ $\pm$ ۴/۳	۲۸/۹ $\pm$ ۲/۲*	۴۳/۷ $\pm$ ۳/۲#	۶۶/۸ $\pm$ ۵/۱

 * اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P > ۰/۰۵$)

 # اختلاف معنادار با گروه سیکلو فسفامید ($P > ۰/۰۵$)


شکل ۱. میکروگراف نوری مربوط به بافت تخمدان در گروه‌های مورد مطالعه

کاهش تولید آروماتاز شده در نتیجه تبدیل آندروژن به استرادیول صورت نمی‌گیرد و تولید این هورمون کاهش میابد^{۲۰، ۲۱}. بنابراین، مدل ایجاد شده در این مطالعه از پايایی لازم برای ارزیابی مداخلات محافظتی برخوردار است.

اثر محافظتی آنتوسیانین‌ها در این مطالعه را می‌توان با اثرات سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب طبیعی که بر روی سمیت تخمدانی سیکلوفسفامید آزمایش شده‌اند، مقایسه کرد. برای مثال، ملک اغلو و همکاران نشان دادند که کورکومین می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و مارکرهای آپوپتوز، از آسیب تخمدانی ناشی از سیکلوفسفامید جلوگیری کند^{۲۲}. نقطه قوت مطالعه حاضر نشان دادن اثر هم‌زمان آنتوسیانین‌ها بر هر دو بعد عملکردی (هورمونی) و ساختاری (بافتی) تخمدان، به‌ویژه جلوگیری از فیروز است. این اثر جامع‌تر از برخی مطالعات است که تنها بر روی یک جنبه متمرکز شده‌اند.

اگرچه در مطالعه حاضر مارکرهای استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشدند، اما مطالعات پیشین نشان داده‌اند که آنتوسیانین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی هستند. بنابراین، بهبود شاخص‌های هورمونی و تغییرات هیستولوژیک مشاهده‌شده در این پژوهش ممکن است تا حدودی ناشی از این مکانیسم‌ها باشد. با این حال، این فرضیه در مطالعه حاضر به‌طور مستقیم بررسی نشده و برای تأیید آن انجام مطالعات مولکولی آینده ضروری است. مکانیسم عمل آنتوسیانین‌ها احتمالاً از ترکیبی از راهکارها نشأت می‌گیرد:

- بر اساس مطالعات پیشین، آنتوسیانین‌ها ممکن است از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی و کاهش استرس اکسیداتیو اثرات محافظتی خود را اعمال کنند؛ با این حال، در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یا شاخص‌های استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری نشد. یافته‌های قاسم رستمی و همکاران در مورد محافظت آنتوسیانین‌ها از بافت بیضه، نشان داد که این ترکیبات احتمالاً با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، از استرس اکسیداتیو القا شده توسط سیکلوفسفامید می‌کاهد.^{۲۳}

- مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آنتوسیانین‌ها قادر به تعدیل مسیرهای التهابی مانند NF-κB هستند، اما از آنجا که هیچ‌یک از مارکرهای التهابی در این پژوهش ارزیابی نشد، این مکانیسم تنها به‌عنوان یک توضیح احتمالی برای یافته‌های حاضر مطرح می‌شود. اسپیشال و همکاران نشان دادند سیانیدین-۳-

با بررسی قطر لایه گرانولوزا در فولیکول‌های انترال مشخص شد که میانگین قطر لایه گرانولوزا در گروه سیکلوفسفامید به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($P < 0.05$). از سوی دیگر، مقایسه بین گروه درمانی با آنتوسیانین و گروه سیکلوفسفامید نشان داد که قطر این لایه سلول در گروه درمانی نسبت به گروه سیکلوفسفامید به‌طور معناداری بیشتر بود ($P > 0.05$) (جدول ۳).

بحث

نتایج این مطالعه به‌وضوح نشان‌دهنده اثرات سمی قابل توجه سیکلوفسفامید بر عملکرد و ساختار تخمدان موش‌های ماده و همچنین پتانسیل محافظتی قوی آنتوسیانین‌ها است. یافته‌های ما نه تنها با تحقیقات پیشین در زمینه سمیت تخمدانی شیمی‌درمانی همسو است، بلکه نقش مهمی در تأیید کاربرد یک ترکیب طبیعی با مکانیسم عمل چندوجهی در حفاظت از ذخیره تخمدانی دارد.

مطالعه حاضر به‌وضوح الگوی نارسایی زودرس تخمدان (POI) القا شده توسط سیکلوفسفامید را بازتولید کرد. کاهش وزن تخمدان و تغییرات هورمونی مشاهده شده (کاهش AMH، استرادیول و افزایش گنادوتروپین‌ها) کاملاً با مطالعات کلاسیک در این زمینه هم‌خوانی دارد. برای مثال، مورگان و همکاران به‌طور مفصل شرح دادند که چگونه آلکیل‌کننده‌هایی مانند سیکلوفسفامید با آسیب به DNA سلول‌های در حال تکثیر سریع لایه گرانولوزا و اُسیت‌ها، منجر به آپوپتوز و تخریب فولیکول‌ها می‌شوند.^{۱۵} یافته هیستوپاتولوژیک کلیدی ما، یعنی افزایش شدید فیروز بافتی و آسیب تخمدانی، نیز توسط لیخیان و همکاران در سال گزارش شده است که آن را به فعال‌سازی طولانی مدت مسیرهای التهابی و پروفیبروتیک مانند TGF-β نسبت دادند.^{۱۶} همچنین پینگ و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۵ نشان دادند که تجویز سیکلوفسفامید منجر به فیروز بافتی تخمدان در موش‌های دریافت‌کننده این دارو می‌شود که دلیل عمده این آسیب مربوط به التهاب بافتی ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید است.^{۱۷} کاهش سطح AMH، که در مطالعه ما بسیار چشمگیر بود، یک بیومارکر استاندارد و حساس برای ارزیابی ذخیره تخمدانی است و یافته‌های کیم و همکاران را مبنی بر ارتباط مستقیم آن با تعداد فولیکول‌های پره انترال تأیید می‌کند.^{۱۸} همچنین، سطوح هورمون‌های استرادیول و پروژسترون در گروه‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید کاهش معناداری داشت که می‌تواند به علت آسیب به سلول‌های گرانولوزا و فولیکولی ایجاد شود. در این زمینه مطالعات نشان داده‌اند که آسیب به سلول‌های گرانولوزا منجر به

۲) ارزیابی عملکرد نهایی باروری: اگرچه بهبود پارامترهای هورمونی و بافتی قویاً حاکی از حفظ باروری است، اما ارزیابی مستقیم عواملی مانند نرخ تخمک‌گذاری، کیفیت اووسیت، نرخ لقاح و نتیجه بارداری در رت‌های تحت درمان، نتیجه‌گیری را تکمیل و قدرت آن را برای ترجمه بالینی افزایش می‌دهد.

۳) مطالعات فارماکوکینتیک و فرمولاسیون: بررسی جذب، توزیع، متابولیسم و دفع (ADME) آنتوسیانین‌ها و آزمایش فرمولاسیون‌های مختلف برای افزایش زیست‌دسترسی آن‌ها، گام ضروری بعدی است.

۴) مقایسه با سایر عوامل محافظ شناخته شده: مقایسه مستقیم کارایی و عوارض جانبی آنتوسیانین‌ها با سایر عوامل کمپروتکتیو مورد مطالعه (مانند آگونیست‌های GnRH یا ایندرازول‌ها) در یک مدل آزمایشگاهی یکسان، می‌تواند جایگاه واقعی آن‌ها را در استراتژی‌های حفظ باروری مشخص کند.

مهم‌ترین محدودیت این مطالعه، عدم ارزیابی مستقیم شاخص‌های استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در بافت تخمدان بود. بنابراین، اگرچه یافته‌های هورمونی و هیستولوژیک نشان‌دهنده اثر محافظتی آنتوسیانین هستند، اما مکانیسم‌های مولکولی مسئول این اثرات به‌طور مستقیم در این مطالعه بررسی نشدند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده شاخص‌هایی مانند MDA، SOD، CAT، GPx، TNF- α ، IL-1 β ، IL-6، Bax، Bcl-2 و Caspase-3 برای روشن شدن مکانیسم‌های اثر آنتوسیانین مورد ارزیابی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز آنتوسیانین موجب بهبود شاخص‌های هورمونی و ویژگی‌های هیستولوژیک تخمدان در رت‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید شد. با وجود آنکه مطالعات پیشین خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی آنتوسیانین را گزارش کرده‌اند، این مکانیسم‌ها در پژوهش حاضر به‌طور مستقیم بررسی نشدند؛ بنابراین، تبیین دقیق سازوکارهای مولکولی نیازمند مطالعات تکمیلی است.

قدرانی‌ها

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز تشکر و قدرانی می‌کنند. همچنین، نویسندگان این مقاله از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان ولیعصر تبریز بخاطر کمک‌های غیر مالی صمیمانه سپاسگزارند.

گلوکوزید (یک آنتوسیانین رایج) با مهار فاکتور رونویسی پیش‌التهابی NF- κ B، از التهاب عروقی جلوگیری می‌کند.^{۲۳} مهار این مسیر در بافت تخمدان می‌تواند منجر به کاهش بیان سیتوکین‌های التهابی (مانند TNF- α و IL-6) و در نهایت جلوگیری از روند فیبروز شود.

• بهبود تعداد فولیکول‌های سالم و ضخامت لایه گرانولوزا ممکن است با کاهش آپوپتوز سلولی مرتبط باشد؛ با این حال، پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز نظیر Bax، Bcl-2 و Caspase-3 در این مطالعه اندازه‌گیری نشدند و بنابراین این مکانیسم نیازمند بررسی در مطالعات آینده است. مطالعه باربرینو و همکاران که مستقیماً اثر آنتوسیانین را بر آسیب تخمدانی سیکلوفسفامید در موش بررسی کرد، کاهش بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند Bax و کاسپاز-۳ را گزارش نمود.^{۲۴} این یافته مکانیسم احتمالی مشاهده کاهش آترزی فولیکولی در مطالعه حاضر را تقویت می‌کند.

با توجه مطالعات بررسی شده، اثربخشی درمان با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، یافته‌ای کلیدی و قابل‌تأمل محسوب می‌شود. این الگو نشان می‌دهد که برای خنثی‌سازی طوفان اکسیداتیو و التهابی ناشی از سیکلوفسفامید، دستیابی به یک غلظت آستانه‌ای موثر از آنتوسیانین در بافت ضروری است. این موضوع از منظر ترجمه بالینی اهمیت ویژه‌ای دارد؛ زیرا تعیین دوز مؤثر و ایمن برای مصرف انسانی را به یکی از اولویت‌های پژوهشی تبدیل می‌کند.^{۲۴} مقایسه نتایج هورمونی پژوهش حاضر با مطالعات مشابه، بیانگر پتانسیل بالای آنتوسیانین‌ها است. بازیابی سطح AMH و استرادیول در گروه دریافت‌کننده دوز بالا، قابل مقایسه با اثرات گزارش شده برای مداخلات قوی‌تری مانند مهارکننده‌های آپوپتوز یا استفاده از هورمون‌های محافظت‌کننده است. این موضوع نشان می‌دهد که یک مداخله تغذیه‌ای یا مکمل‌یاری ساده (در صورت تأیید در مطالعات انسانی) می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر حفظ عملکرد اندوکراین تخمدان داشته باشد. برادران باقری و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که آنتوسیانین سبب بالانس سطح هورمون‌های گنادوتروپین و همچنین افزایش سطح استرادیول می‌شود.^{۲۴} با وجود شواهد قوی ارایه شده، این مطالعه محدودیت‌هایی دارد که مسیر تحقیقات آتی را روشن می‌سازد.

۱) مکانیسم‌های مولکولی: ارزیابی مستقیم مارکرهای استرس اکسیداتیو (مانند مالون دی‌آلدئید MDA و سطح گلوتاتیون GSH، التهابی (سطح سیتوکین‌ها) و آپوپتوز (پروتئین‌های Bax، Bcl-2، Caspase-3) در بافت تخمدان می‌تواند مکانیسم عمل آنتوسیانین‌ها را به طور قطعی‌تر اثبات کند.

مشارکت پدیدآوران

ایده‌پردازی توسط فریده اکبری و سویل غفارزاده‌راد، طراحی اثر توسط فریده اکبری و سویل غفارزاده‌راد، جمع‌آوری داده‌ها توسط فریده اکبری و راضیه وجدانی، تحلیل و تفسیر داده‌ها توسط سویل غفارزاده‌راد و شبنم یعقوبی کندلاجی، تهیه پیش‌نویس توسط سویل غفارزاده‌راد و شبنم یعقوبی کندلاجی، نقد و بررسی مقاله از جهت محتوای فکری توسط فریده اکبری و راضیه وجدانی انجام گرفت.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارایه می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان مقاله حاضر هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل این تحقیق بر اساس پرتکل مصوبه کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تأیید قرار گرفت (کد اخلاق: IR.TBZMED.AEC.1403.061).

منابع مالی

نویسندگان مقاله برای انجام این پروژه از هیچ مرکزی منبع مالی دریافت نکرده‌اند و هزینه‌های مطالعه توسط نویسندگان تهیه شده است.

References

- Delkhosh A, Delashoub M, Tehrani AA, Bahrami AM, Niazi V, Shoorei H, et al. Upregulation of FSHR and PCNA by administration of coenzyme Q10 on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a mouse model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019;33(11):e22398. doi: 10.1002/jbt.22398
- Sharata EE, Bakry T, Atta HG, Mohammed HA, Diab NS, Atef RA, et al. Molecular mechanisms underlying cyclophosphamide-induced ovarian injury and protective strategies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2026;399(2):1951-85. doi: 10.1007/s00210-025-04550-9
- Wu J, Wei Y, Peng Q, Zhu J, Shi H, Zhao T, et al. Mechanisms of cell senescence and apoptosis in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats. *J Ovarian Res*. 2025;18(1):172. doi: 10.1186/s13048-025-01759-3
- Soliman SS, Suliman AA, Fathy K, Sedik AA. Ovario-protective effect of Moringa oleifera leaf extract against cyclophosphamide-induced oxidative ovarian damage and reproductive dysfunction in female rats. *Sci Rep*. 2025;15(1):1054. doi: 10.1038/s41598-024-82921-7
- Olowe TG, Oyovwi MO, Nwangwa KE, Ohwin EP, Oghenetega OB. Cytotoxic Properties of Cyclophosphamide: A Focus on Its Mechanistic Impacts on Male Gonadal Functions. *J Explor Res Pharmacol*. 2024;9(2):106-15. doi: 10.14218/jerp.2023.00025s
- Zhou L, Liu Z, Wang W, Yao M, Wang J, Liu Y, et al. Anthocyanins in Black Wolfberry (*Lycium ruthenicum* Murray): Chemical Structure, Composition, Stability and Biological Activity. *Food Reviews International*. 2025;2:1-29. doi: 10.1080/87559129.2025.2483812
- Sadowska-Bartosch I, Bartosz G. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Anthocyanidins: A Critical Review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12001. doi: 10.3390/ijms252212001
- Kiadehi FB, Samani P, Barazandeh S, Pam P, Hajipour A, Goli N, et al. The Effect of Anthocyanin Supplementation on Pro-Inflammatory Biomarkers in Patients With Metabolic Disorders: A Grade-Assessed Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2024;102:100772. doi: 10.1016/j.curtheres.2024.100772
- Borda MG, Ramírez-Vélez R, Botero-Rodriguez F, Patricio-Baldera J, de Lucia C, Pola I, et al. Anthocyanin supplementation in adults at risk for dementia: a randomized controlled trial on its cardiometabolic and anti-inflammatory biomarker effects. *Geroscience*. 2026;48(1):563-76. doi: 10.1007/s11357-025-01669-8
- Chen J, Xu B, Sun J, Jiang X, Bai W. Anthocyanin supplement as a dietary strategy in cancer prevention and management: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(26):7242-54. doi: 10.1080/10408398.2021.1913092
- Shi N, Chen X, Chen T. Anthocyanins in Colorectal Cancer Prevention Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(10):1600. doi: 10.3390/antiox10101600
- Li W, Peng C, Zhaojie L, Wei W. Chemopreventive and therapeutic properties of anthocyanins in breast cancer: A comprehensive review. *Nutr Res*. 2022;107:48-64. doi: 10.1016/j.nutres.2022.08.005

13. Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2517514. doi: 10.1155/2016/2517514
14. Ahmadi N, Afshin KA, Khodarahmi P, Baharara J, Zakerbostanabadi S. Effect of anthocyanin on oxidative stress and testis structure in streptozotocin-induced diabetic rats. 2023;10(2):56-60. doi: 10.34172/cjmb.2023.09
15. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):525-35. doi: 10.1093/humupd/dms022
16. Cheng L, Shi H, Jin Y, Li X, Pan J, Lai Y, et al. Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice. *Endocrinology*. 2016;157(12):4875-87. doi: 10.1210/en.2015-2080
17. Nie P, Yao B, Zhang Z, Li J, Wang M, Lash GE, et al. Metformin protects against cyclophosphamide-induced ovarian fibrosis by MIF/CD74-mediated macrophage polarization. *J Transl Med*. 2025;23(1):1273. doi: 10.1186/s12967-025-07294-5
18. Kim J, You S. After cyclophosphamide exposure, granulosa cells recover their anti-müllerian hormone-producing ability but not their numbers. *Cytometry A*. 2021;99(8):807-13. doi: 10.1002/cyto.a.24297
19. Shoorei H, Seify M, Talebi SF, Majidpoor J, Dehaghi YK, Shokoohi M. Different types of bisphenols alter ovarian steroidogenesis: Special attention to BPA. *Heliyon*. 2023;9(6):e16848. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16848
20. Ebrahimi M, Fani M, Abtahi-Evari S, Brazvan B, Azin S, Shokoohi M, et al. The effect of Safranal on histological damages and oxidative stress induced by ischemia-reperfusion in adult rat ovaries. *Physiol Pharmacol*. 2025;29(2):184-93. doi: 10.61882/phypha.29.2.184
21. Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):33. doi: 10.1186/s13048-018-0409-9
22. Rostami G, Navabakhsh MR, Salami SS, Rezaei M, Hasannezhad E, Rahimi Mamaghani A, et al. Antiapoptotic effects of anthocyanin on testicular damage induced by varicocele in male rats. *Biotech Histochem*. 2026;101(2):84-95. doi: 10.1080/10520295.2025.2595962
23. Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F, Cimino F. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF- α -induced endothelial dysfunction: involvement of nuclear factor- κ B signaling. *J Agric Food Chem*. 2010;58(22):12048-54. doi: 10.1021/jf1029515
24. Bagheri RB, Chavoshinezhad N, Barghi B, Soleymaniinallou M, Shokoohi M, Najafnezhad P, et al. Effects of Cornus mas Extract (Anthocyanin) and Treadmill Exercise on Hormonal and Histological Effects in the Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Women's Health & Reproduction Sciences*. 2025;13(1):37-43. doi: 10.15296/ijwhr.2024.6004