ORIGINAL ARTICLE

Effect of Licorice Plant (Glycyrrhiza glabra) on In vitro Maturation of Immature Oocytes and Embryonic Development in NMRI Mice

Zakieh Esmailii[1],
Nasim hayati roodbari[2],
Simin mohammady gorji[3],
Kazem parivar[4]

[1] MSc Student in Biology Animal science Developmental Cell Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran
[4] Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

(Received November 20, 2016 Accepted June 19, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Glycyrrhiza glabra* is a perennial plant with some major food and medicinal compounds that has received attention by food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to investigate the effect of licorice on in vitro maturation of immature oocytes on NMRI mice.

Materials and methods: In this experimental study, the animals were randomly divided into five groups: a control, a sham and three experimental groups. The mice were injected intraperitoneally with 7.5 IU PMSG to stimulate ovulation. The control group, received only water and food. The sham animals were gavaged with 200 ml of distilled water for 7 days. The three experimental groups were given daily injection of 100, 200, and 500 µL licorice by oral gavage for 7 days. The mice were sacrificed on day 8, the ovaries were then removed and investigated for oocytes reaching metaphase II (MII) within 24 hours. The oocytes were fertilized by the sperm of male mice and investigated after 24 and 48 hours after in vitro fertilization (IVF).

Results: Compared with the control group, consumption of licorice extract in experimental groups (II and III) was found to have a positive effect on the number of follicles, oocytes, and number of 2 and 4 cell embryos.

Conclusion: This study showed the beneficial effects of licorice extract due to its Phyto-estrogenic properties on oocyte maturation and infertility.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, NMRI mice, in vitro maturation of oocytes, fertilized oocytes

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (154): 26-37 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۴ آبان سال ۱۳۹۶ (۳۷-۲۶)

بررسی اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان Glycyrrhiza glabra بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI و تکوین جنین‌های حاصل از آن

زکیه اسمعیلی[۱]
نسیم حیاتی رودباری[۲]
سیمین محمدی گرجی[۳]
کاظم پریور[۴]

چکیده

سابقه و هدف: گیاه شیرین‌بیان گیاهی چندساله است که به واسطه دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم، در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی و غذایی قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر عصاره شیرین بیان بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نارس موش نژاد NMRI می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، حیوانات به‌صورت تصادفی به پنج گروه کنترل، شم، تجربی ۱، ۲ و ۳ تقسیم‌بندی شدند. جهت تحریک تخمک‌گذاری از هورمون PMSG به میزان ۷/۵ واحد بین‌المللی برای هر موش به‌صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. موش‌های گروه کنترل فقط آب و غذای مخصوص موش‌ها دریافت کردند. به موش‌های گروه شم در طی ۷ روز، روزانه ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن آب مقطر به‌صورت گاواژ و به موش‌های سه گروه تجربی ۱ و ۲ و ۳ در طی ۷ روز، روزانه به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره ی شیرین بیان از راه دهان به آن‌ها گاواژ شد. سپس موش‌های در روز ۸ تشریح شدند. تخمدان‌های آن‌ها جدا شده وتخمک‌ها جهت رسیدن به مرحله‌ی متافاز دو، طی ۲۴ ساعت بررسی شدند. اووسیت‌هایی که در متافاز دو با اسپرمی که از موش نر به دست آورده شد، لقاح داده شد و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نتایج لقاح آزمایشگاهی تخمک (IVF) بررسی شد.

یافته‌ها: به دنبال مصرف عصاره‌ی گیاه شیرین‌بیان، تأثیرات مثبتی بر روی تعداد فولیکول‌ها، بلوغ تخمک‌ها، تعداد جنین دوسلولی و چهار سلولی در گروه تجربی دو و سه نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

استنتاج: نتایج فوق به دلیل خواص فیتواستروژنیک شیرین بیان نشان‌دهنده‌ی تأثیرات مفید این عصاره بر بلوغ تخمک و باروری می‌باشد.

واژه های کلیدی: گیاه شیرین‌بیان، موش نژاد NMRI، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، لقاح آزمایشگاهی تخمک

مقدمه

شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که در هر دو فرهنگ شرقی و غربی استفاده‌ی چندین هزار ساله دارد(Armanini D ۲۰۱۰ (Irani M et al.,), ۲۰۰۴et al, .(به علاوه در طب سنتی چین به عنوان یک مسکن سرفه، ضدالتهاب، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد پلاکت، ضدویروسی (هپاتیت) استفاده می‌شود (Liu H et al., ۲۰۱۳) .(شیرین‌بیان (Glycyrrhiza glabra) از خانواده‌ی نخودیان (Liguminoceae) است.

مولف مسئول: نسیم حیاتی رودباری– تهران، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران Email: nasimhayati@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ایران
۴. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۹/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۱/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۳/۲۹

Archive of SID
www.SID.ir

عصاره‌ی شیرین‌بیان به‌طور گسترده‌ای در صنایع دارویی و شیرینی‌سازی به‌دلیل حضور glycyrrhizin استفاده می‌شود(Nitalikar MM et al.,2010) .گزارش‌ها حاکی از آن است که این گیاه حاوی ترکیبات دارویی و طبی مانندglycyrrhizin ، اسیدglycyrrhetinic ، globrin A & B، استرول‌های تری ترپنی، ساپونین و ایزوفلانوئید هست .(Sharma V et al., 2013) شیرین‌بیان به علت ارزش اقتصادی و دارویی که برای انسان دارد، بسیار مفید می‌باشد. این گیاه از لحاظ ویتامین‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی (فیتواستروژن‌ها) غنی است و می‌تواند پتانسیل باروری را بهبود بخشد(Yaginuma T et al;1982).

بلوغ تخمک در خارج از بدن یکی از تکنیک‌های کمکی تولیدمثل می‌باشد که خصوصاً برای بسیاری از زنانی که اختلال در بلوغ تخمک در داخل بدن دارند و یا زنان مبتلا به سرطان که در معرض دوزهای بالای اشعه یا شیمی‌درمانی قرار می‌گیرند، روش مناسبی است (Bates RB et al;1999)(Trounson A et al; 2001). بلوغ آزمایشگاهی تخمک IVM باعث می‌شود تا درصد زیادی از تخمک‌های مرحله‌ی ژرمینال وزیکول بتوانند به مرحله‌ی متافاز دو برسند (Suzuki M et al;2006).سابقه ی بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) برای اولین بار در سال ۱۹۵۳ توسط Pincus و Enzman مطرح گردید (Pincus G, Enzmann EV.1935) . محققین مذکور توانستند بدون استفاده از هورمون، تقسیم میوز را در تخمک‌های فولیکول رسیده خرگوش فعال کنند و تخمک‌های نابالغ (GV) را به مرحله GVBD (Germinal vesicle breakdown) برسانند. پس از آن نیز تلاش‌هایی برای بهینه‌سازی این روش انجام شد؛ تا آن جا که برخی از محققین ضمن بلوغ تخمک در آزمایشگاه، جنین نیز به دست آوردند(Nogueira D et al.,2006).

مصرف گیاهان دارویی و هم چنین گیاه شیرین‌بیان در بین مردم از گذشته تاکنون رواج بسیار زیادی پیدا کرده است. هدف از انجام این پژوهش این است که بتوانیم یکی از مشکلات ناباروری را در زنان پیدا و آن را رفع کنیم. بنابراین ما در این تحقیق اثر عصاره‌ی گیاه شیرین‌بیان را بر روی بلوغ تخمک و باروری، مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

روش عصاره گیری

ریشه‌ی گیاه شیرین‌بیان از انستیتو پاستور آمل خریداری شد. برای عصاره‌گیری از روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده شد، بدین صورت که نمونه گیاهی از گیاه سالم و عاری از هر نوع آفت و بیماری انتخاب شد و سپس با آب شستشو داده شد. سپس روی کاغذ سفید و در شرایط دور از تابش مستقیم نور خورشید و در سایه خشک شد. سپس گیاه خشک شده به وسیله آسیاب پودر شد و پودر حاصل در ظرف شیشه‌ای دربسته نگهداری شد و مقدار معین از حلال (اتانول ۷۰ درصد) در آن ریخته شد؛ با محکم کردن درب ظرف عصاره‌گیری، از تبخیر حلال جلوگیری شد. ظرف مورد نظر با فویل کاملاً پوشانده شد. عصاره‌گیری ضمن تکان دادن در دستگاه شیکر به مدت زمان ۴۸ ساعت با دور ۱۲۰ و در دمای اتاق انجام شد و بعد از این زمان که تعادل غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی برقرار شد، عمل عصاره‌گیری خاتمه داده شد و سپس عصاره حاصل با کاغذ واتمن تا سه بار صاف شد و حلال پرانی با دستگاه روتاری انجام شد. غلظت مورد استفاده در ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن عصاره‌ی شیرین‌بیان در۰/۵ سی سی آب مقطر حاصل شد.

بررسی بافت شناسی

تحقیق حاضر با استفاده از موش‌های ماده نژاد NMRIو سن ۸-۶ هفته انجام شد. موش‌های نابالغ به مدت ۶-۷ روز با استفاده از عصاره شیرین‌بیان گاواژ

Archive of SID

www.SID.ir

شـدند. جهـت تحریـک تخمک‌گـذاری از هورمـون PMSGبه میزان ۷/۵ واحـد بین‌المللی بـرای هـر مـوش به‌وسیله سرنگ انسولین به‌صورت تزریق داخـل صـفاقی استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریـقPMSG ، موش‌هـا بـه روش جابـه‌جایی مهره‌هـای گردنـی کشـته شـدند (موش‌هـای گـروه کنتـرل، بـدون دریافـت هـیچ مـاده‌ی خاصی تشریح شدند). برای تشریح موش‌ها، سـطح بـدن آن‌هـا بـه وسـیله‌ی پنبـه‌ی الکلـی ضـدعفونی گردیـده، پوست بدن و پرده‌ی صفاق بریده شد، سپس بافـت‌هـای تخمدان چپ و راست و شاخ‌های رحـم چـپ و راسـت به وسیله‌ی قیچی و پـنس و اسـکالپل جـدا گردیـد و در آب مقطـر شستشـو داده شـد. بعـد از آن در سـرم فیزیولوژی بافت‌های اضافی و چربی جدا شد. هـر کـدام از بافت‌ها در ظرف‌های جداگانه در فرمـالین ۱۰ درصـد قرار داده شد و پس از گذشت ۶-۴ سـاعت، فرمـالین از ظرف‌ها خـالی گردیـد و بـه جـای آن الکـل ۷۰ درصـد جایگزین شد و بافت‌ها تا زمان شروع مراحل الکل‌دهـی در الکـل ۷۰ درصـد بـاقی ماندنـد. تخمک‌هـای نـارس گرفته شده از موش در محیط رسیدگی شامل α MEM- حـاویFBS ، rhFSH، hCGو Pen- strep قـرار داده شد. سپس تخمک‌های بـالغ شـده بعـد از ۲۴ سـاعت در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. سـپس بافـت‌هـا، الکل‌دهی و قالب‌گیری شدند و بعد از برش‌دهی، تهیه‌ی لام و رنگ آمیزی با H&E توسط استریومیکروسـکوپ بررسی شدند.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک

تخمک‌هـای GV بـه شـکل کـروی، سیتوپلاسـم روشن، قشر شفاف زوناپلوسیدا بـا فضـای پـری ویتلینـی مناسـب بـه‌عنـوان تخمـک سـالم در ۵ گـروه انتخـاب و کشت داده شدند. محیط بلـوغ کـه بـرای گـروه کنتـرل شـامل α MEM- ، FBS، rhFSH، hCGو Pen-strep می‌باشد و برای گروه شم، تخمک نارس گرفتـه شـده از موش‌های ماده با آب خوراکی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر، بدون عصاره به هر مـوش بـه مـدت ۷ روز گـاواژ شـد و سپس در محیط بلـوغ قـرار داده شـد و بـه ترتیـب بـرای گـروه تجربـی ۱، ۲ و ۳ تخمـک نـارس گرفتـه شـده بـه موش‌هـای مـاده بـا عصـاره بـه غلظـت ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به هر موش گاواژ شـد و سـپس در محـیط رسـیدگی قـرار داده شـد. تخمک‌هـای هـر گـروه در انکوبـاتور CO2 قـرار داده شـدند. بلـوغ تخمک‌هـا بـا اسـتفاده از میکروسـکوپ معکوس، ۲۴ ساعت بعد در گروه‌ها بررسی شـد. از بـین تخمک‌هـای موجـود در هـر گـروه بسـته بـه شـرایط آزمایشی به کار رفته در مطالعه، در تعدادی از تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده شـد(GV). در تعـدادی هسته‌شـان شکسـته شـد (GVBD) و تعـدادی بـالغ شدند(MII). هم‌چنین در برخـی از گروه‌هـا تعـدادی از تخمک‌هـا، تخریـب شـدند(Deg). از تخمک‌هـایی کـه دارای جسـم قطبـی بودنـد، جهـت اسـتفاده در لقـاح آزمایشگاهی تخمک (IVF) استفاده شد.

بلوغ و تکوین آزمایشگاهی تخمک

تخمک‌های بالغ شده از گروه‌های آزمایشی کنترل، شم، ۱، ۲ و ۳، جهت انجام IVF بررسی شد. ابتدا محیط بلـوغ اسـپرم بـا اسـتفاده از پتـری دیـش ۳۵ میلـی‌متـری جهـت IVFبـا قطـرات ۳۰ میکرولیتـری در ایـن ظـرف کشت قطره‌گذاری شدند. سپس به میزان کافی از روغن معدنی، برای جلـوگیری از خشـک شـدن محـیط اضـافه شد. محیط IVF بـرای موش‌هـای نـر حـاویT6 ، FBS، پنی‌سیلین و استرپتومایسـین سـاخته شـد. پـس از نخـاعی کردن، دم اپیدیدیم آن‌ها را جدا کرده، اسپرم‌ها به مدت یـک سـاعت در انکوبـاتور ۳۷ درجـه سـانتی گـراد و ۵ درصد CO2 به منظور ظرفیت‌گیری اسپرم قرار داده شد. بعـد از اتمـام یـک سـاعت، محـیط حـاوی اسـپرم از انکوباتور خارج شد. اسپرم‌های فعال بـا تحـرک بـالا بـه کناره‌هـای قطـره مهـاجرت کردنـد. اسـپرم‌های فعـال بـه کمک پیپت از کناره‌های قطره برداشته شـد و بـه محـیط

Archive of SID
www.SID.ir

تخمک‌های بالغ اضافه شد. تخمک و اسپرم جهت لقاح به مدت سه ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از اتمام سه ساعت، اسپرم‌ها از تخمک‌ها جدا و تخمک‌ها وارد محیط بلوغ شدند. تخمک‌ها به‌منظور تشکیل جنین دو سلولی و چهار سلولی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.

آنالیز داده‌ها

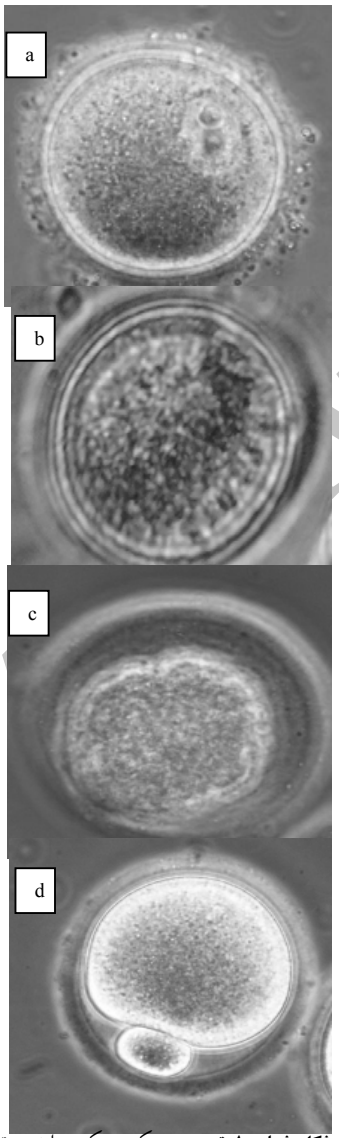
برای بررسی داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics ver۲۲ و آنالیز واریانس یک‌طرفه ONE WAY ANOVA و آزمون Tukey استفاده شد و هیستوگرام‌های مربوطه توسط نرم‌افزار Microsoft Excel ۲۰۱۳رسم گردید. در تمامی مراحل $p<0/05$ ، $p<0/01$، $p<0/001$به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

در طرح تحقیقاتی حاضر مشاهده شد عصاره‌ی گیاه شیرین‌بیان بر تخمک نابالغ موش در غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن طی بلوغ در شرایط آزمایشگاهی در از سرگیری میوز، شکسته شدن هسته و آزاد شدن اولین جسم قطبی و بلوغ تخمک‌ها تأثیر دارد و توان آن‌ها را برای بلوغ با کیفیت بالاتر افزایش می‌دهد (شکل شماره ۱). تجویز دوز مناسب ۰/۰۰۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن از عصاره‌ی شیرین‌بیان در تخمک نابالغ می‌تواند منجر به تکامل اووسیت‌های مرحله وزیکول زاینده به مرحله متافاز II شود (شکل شماره ۲)، اما در این تحقیق، گیاه شیرین‌بیان سبب شده تعداد تخمک‌هایی که به M2 برسند، در گروه تجربی یک، دو و سه در مقایسه با گروه کنترل و شم اختلاف معنی‌داری را نشان دهد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تأثیر سطوح تیمار بر میانگین تخمک‌های نارس

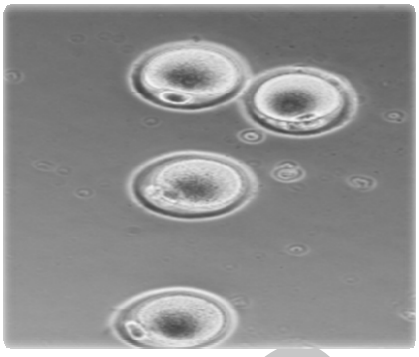
گروه‌ها	تعداد تخمک	توقف در GV	متافاز یک	متافاز دو
کنترل	۱۰۳	۱۲	۳۰	۵۱
گروه شم	۹۷	۱۵	۲۴	۴۴
گروه تجربی ۱۰۰	۹۸	۱۳	۱۱	۵۹
گروه تجربی ۲۰۰	۱۰۰	۱۱	۱۳	۶۲
گروه تجربی ۵۰۰	۱۳۳	۱۰	۲۶	۸۲



شکل شماره ۱: تصویر میکروسکوپ اینورت از a; تخمک نارس .d .GVBD :c MII ;b (GV)؛ تخمک دژنره. x۱۰

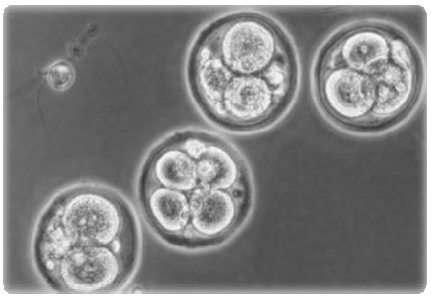
Archive of SID

www.SID.ir

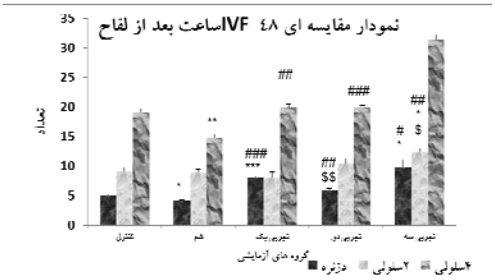


شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپ اینورت از تخمک بالغ شده ی حاصل از عصاره ی شیرین بیان. x۱۰

نتایج حاصل از IVF، ۴۸ ساعت بعد از لقاح نشان داد که دوز ۰/۰۰۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن، بهترین دوز بود و سبب شد جنین‌های ۴ سلولی تشکیل شده در گروه تجربی یک و دو و سه نسبت به کنترل و شم اختلاف معناداری را نشان دهد (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: تصویر میکروسکوپ اینورت از تشکیل جنین ۲ سلولی و جنین ۴ سلولی گروه تجربی سه در زیر میکروسکوپ x۱۰



نمودار شماره ۱: نمودار مقایسه‌ای نتایج IVF ، ۴۸ ساعت بعد در گروه شم و تجربی ۲، ۱۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل

*۰/۰۵ "<pدر مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل

**۰/۰۱ >pدر مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل

*** P<0.001 در مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل

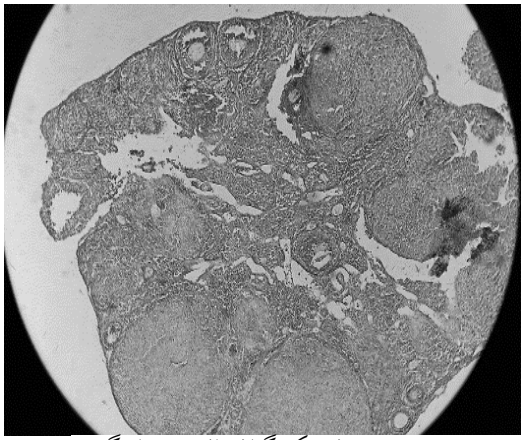
نتایج حاصل از بررسی جنین شناسی

نتایج حاصل از بررسی بافت تخمدان نشان می‌دهد که گاواژ عصاره‌ی شیرین بیان به موش‌ها باعث افزایش چشمگیر تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه در گروه تجربی دو و سه شد. تعداد جسم زرد در گروه تجربی دو و سه به طور چشمگیری نسبت به گروه تجربی یک کاهش پیدا کرد (نمودار شماره ۲). نتایج به طور کامل در شکل شماره ۴ و جدول شماره ۲ آورده شده است.

در تصویر ۴-۱ فتومیکروگراف مقطع تخمدان گروه کنترل مشاهده می‌گردد که در آن تعداد فولیکول‌ها بسیارکم است.

شکل شماره ٤-۱: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه کنترل با بزرگ نمایی ۴۰× با رنگ آمیزی H&E
(Aفولیکول اولیه/ B: فولیکول ثانویه/ C: فولیکول گراف/ D: جسم زرد)

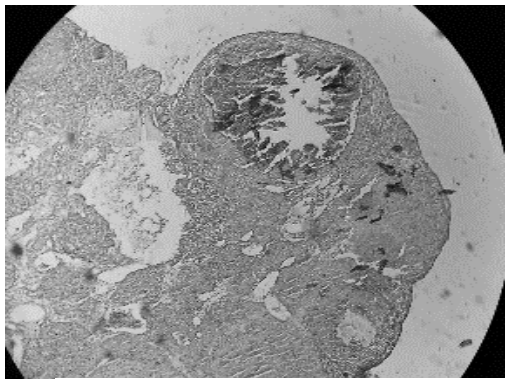
در تصویر شماره ۴-۲فتومیکروگراف مقطع تخمدان گروه شم آمده است که در آن نیز همانند گروه کنترل، تعداد فولیکول‌ها کم است.



شکل شماره ٤-۲: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه شم با بزرگ نمایی ۴۰× با رنگ آمیزی H&E
(:A فولیکول اولیه/ B: فولیکول ثانویه/ C: فولیکول گراف/ D: جسم زرد)

www.SID.ir

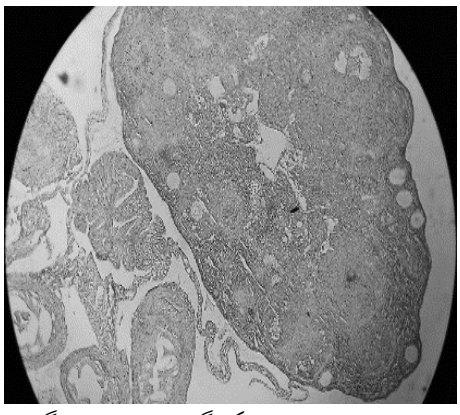
در تصـویر شـماره ۴-۳ فتـومیکروگرافی از مقطـع تخمـدان گـروه تجربـی اول بـا دوز ۱۰۰ میکرولیتـر شیرین‌بیان، تعداد فولیکول‌های تخمـدان رو بـه افـزایش است.



شکل شماره ٤-۳: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گـروه تجربی یک با بزرگ نمایی ۴۰× با رنگ‌آمیزیH&E

(A: فولیکول اولیه/ B: فولیکول ثانویـه/ C: فولیکـول گـراف/ D: جسم زرد)

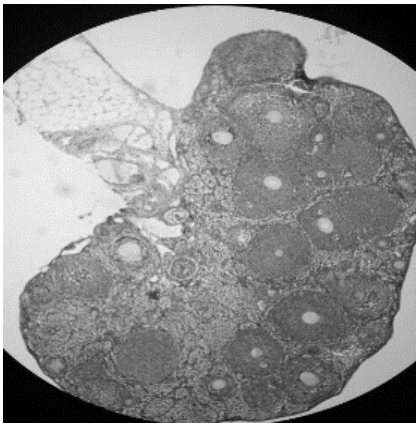
در تصـویر شـماره ۴-۴، فتـومیکروگرافی از مقطـع تخمدان گروه تجربی دوم با دوز ۲۰۰ میکرولیتر شـیرین بیـان، تعـداد فولیکـول‌هـای تخمـدان هـم‌چنـان در حـال افزایش است.



شکل شماره ٤-٤: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گـروه تجربی دو با بزرگ نمایی ۴۰× با رنگ آمیزیH&E

(A: فولیکول اولیه/ B: فولیکول ثانویـه/ C: فولیکـول گـراف/ D: جسم زرد)

تصویر شماره ۴- ۵، فتومیکروگراف مقطع تخمدان گـروه تجربـی سـوم بـا دوز ۵۰۰ میکرولیتـر شـیرین‌بیان اسـت. همـان‌طور کـه مشـاهده مـی‌شـود، تعـداد انـواع فولیکول‌های تخمدانی در این گروه بسیار افـزایش یافتـه است.

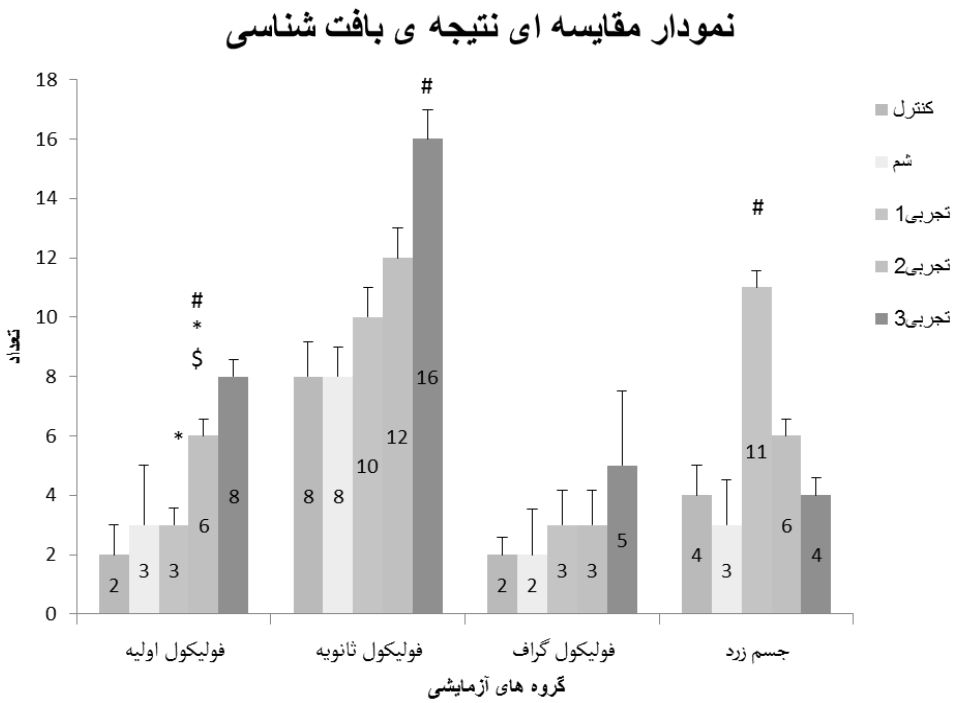


شکل شماره ٤-٥: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گـروه تجربی دو با بزرگ نمایی ۱۰× با رنگ آمیزیH&E

(A: فولیکول اولیه/ B: فولیکول ثانویـه/ C: فولیکـول گـراف/ D: جسم زرد)

شـکل شـماره ۴: فتـومیکروگراف هـای مقـاطع میکروسکوپی تخمدان با بزرگ نمایی x۴۰ رنگ‌آمیزی هماتوکسین ائوزین در گروه‌هـای کنتـرل (a)، شـم (b)، تجربـی یـک (c)، دو (d) و سـه (e) بـا دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر شیرین‌بیان است.

www.SID.ir



نمودار شماره ۲: نمودار مقایسه‌ای نتایج بافت شناسی تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل و شم

* $P<0.05$" در مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل

بحث

از آن‌جایی که استفاده از گیاهان دارویی روز به روز در حال فزونی است، مطالعات زیادی به بررسی اثرات مضر یا مفید احتمالی انواع این گیاهان بر سلامت انسان و سایر موجودات، به عنوان مدل‌های انسانی پرداخته و تاثیر آن‌ها بر اندام‌های مختلف از جمله مغز، کلیه، پوست، ریه و غیره را مورد بررسی قرار داده‌اند. در بسیاری از این مطالعات گزارش شده که ممکن است یک نوع گیاه دارویی بر روی بخشی از بدن تاثیرات منفی داشته باشد و یا در کارکرد آن اختلال ایجاد کند، ولی در بخش دیگری از بدن، تاثیرات مثبتی را بر جای بگذارد. ما در این بخش فقط به پژوهش‌هایی می‌پردازیم که تاثیرات دارویی را بر بلوغ تخمک‌ها مورد بررسی قرار داده اند.

شیرین‌بیان به علت ارزش اقتصادی و دارویی که برای انسان دارد، بسیار مفید می‌باشد. این دانه از لحاظ ویتامین‌ها و لیگان‌های آنتی‌اکسیدانی (فیتواستروژن‌ها) غنی است و می تواند پتانسیل باروری را بهبود بخشد. Brzezinskiو همکاران در سال ۱۹۹۷ طی مطالعه‌ای که در آن از رژیم غذایی غنی شده از دانه کتان و سویا، استفاده کردند، پی بردند که این گیاهان می‌توانند سبب بهبود باروری شوند. آن‌ها دلیل تأثیر این رژیم غذایی بر بهبود باروری را مرتبط با فیتواستروژن‌های موجود در دانه کتان و سویا دانسته‌اند(Brzezinski ، .(1997در تحقیق حاضر، فیتواستروژن موجود در شیرین بیان سبب بهبود باروری شده است. گیاه گزنه منبع قابل دسترسی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد، بنابراین بلوغ تخمک را افزایش می‌دهد(Ozen,2003) . هم‌چنین محققان پی بردند که گیاه دیو سپیروس لوتوس دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن مقادیر قابل‌توجهی آنتی‌اکسیدان می‌تواند بر روند بلوغ تخمک تأثیرگذار باشد .(Nabavi SM et al;2009) در

www.SID.ir

این تحقیق نشان دادیم که شیرین‌بیان به دلیل خاصیت فیتواستروژنی، سبب تخمک‌گذاری منظم و بهبود بارداری شده است. نتایج مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره گیاه شیرین بیان جهت القاء تخمک گذاری، باعث افزایش معنی دار هورمون های استرادیول در موش های نابالغ گروه تجربی یک و دو و سه در مقایسه با گروه کنترل گردید. این امر با نتایج مطالعه Dumesic و همکارانش همسو می‌باشد. گلیسیریزین یک ترکیب تریترپنوئید است که باعث شیرینی ریشه شیرین‌بیان می‌شود. Armaniniو همکارانش عنوان کردند که گلیسیریزین یا متابولیک‌های آن بر روی آنزیم بتا- هیدروکسی استروئید دهیدروژناز که باعث تبدیل ۱۷ -هیدروکسی پروژسترون به آندروستندیون می‌شود، عمل می‌کند و به‌طور مؤثر تستوسترون را کاهش می‌دهد (Armanini D et al;2007) هم‌چنین گلابریدین و گلابرن در شیرین‌بیان، فعالیت شبه استروژنی دارند که منجر به افزایش فعالیت آروماتازی می‌شوند (Tamaya T et al;1986) در پژوهش دیگری که Dumesic و همکارانش انجام دادند، شیرین‌بیان با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی که دارد، باعث کاهش میزان رادیکال‌های آزاد می‌شود (Tamaya T et al;1986). استروژن در پیشبرد رشد و تکامل فولیکول‌ها نقش دارد. شیرین‌بیان نیز یکی از منابع غنی از لیگنان‌ها و یک نوع عمده از فیتواستروژن‌ها است، در نتیجه استفاده از آن در برنامه غذایی برای سلامتی توصیه می‌شود. با توجه به یافته‌های ما، میزان بهبود جنین در شرایط آزمایشگاهی و تکوین آن ممکن است به دلیل آنتی اکسیدانی و فیتواستروژنی در طول IVM باشد. گیاه شیرین‌بیان نیز حاوی آنتی‌اکسیدان و ویتامین A, B, C, Dو فلاوونوئیدها می‌باشد که به‌نوبه‌ی خود سبب افزایش تعداد و رشد فولیکول‌ها می‌شود که تأثیر مثبت بر بلوغ تخمک‌ها و باروری می‌تواند داشته باشد (Asl MN et al;2008). در کار تحقیقاتی حاضر، عصاره شیرین بیان با خواصی که ذکر شد، سبب افزایش بلوغ تخمک گردید.

با توجه به این که داروهای شیمیایی باعث ایجاد اثرات جانبی می‌شوند و از طرفی امروزه بررسی‌های متعددی در زمینه گیاهان دارویی صورت گرفته و به اثرات مفید گیاهان دست یافته‌اند، در این تحقیق، گیاه شیرین بیان از خانواده لگومیناسه جهت بررسی بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها و لقاح آزمایشگاهی اووسیت‌ها استفاده گردید. براساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که تعداد اووسیت‌های نابالغی که به مرحله متافاز II رسیدند، در گروه تجربی سه نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشت. هم‌چنین درصد اووسیت‌های لقاح یافته و جنین‌های دوسلولی و درصد بلاستوسیست‌ها در گروه تجربی سه نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشت و این در حالی بود که گروه تجربی یک و دو با عصاره شیرین بیان نسبت به گروه تجربی سه کاهش معنی‌دار دیده شد. یافته‌های Dumesic و همکارانش مشاهدات ما را تایید می‌کند (Dumesic DA,2008). آن‌ها نشان دادند گلیسیریزین یک ترکیب تریترپنوئید است که باعث شیرینی ریشه شیرین بیان می‌شود. هم‌چنین در پژوهش دیگری که Dumesicو همکارانش انجام دادند، شیرین‌بیان با توجه به خواص آنتی اکسیدانی که دارد، باعث کاهش میزان رادیکال های آزاد در افراد مبتلا به PCOSشد(Tamaya T,1986).

به‌طور کلی این تحقیق نشان داد ترکیبات موجود در عصاره شیرین‌بیان که دارای خواص آنتی اکسیدانی و شبه استروژنی می‌باشند، باعث افزایش میزان IVM، لقاح و تکامل جنینی می‌شود. با توجه به یافته‌های Dumesic , Armanini و

www.SID.ir

همکارانش، از این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شیرین‌بیان به دلیل داشتن خواص فیتواستروژنی و آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش تستوسترون و استروژن می‌گردد. هم‌چنین میزان بلوغ تخمک‌ها به دنبال استفاده شیرین‌بیان افزایش می‌یابد. نتایج تحقیق پیش رو نشان داد مصرف شیرین‌بیان در دوز مناسب می‌تواند در بهبود باروری موثر باشد. از این رو می‌توان پیشنهاد کرد از شیرین‌بیان به‌دلیل خاصیت فیتواستروژنی برای درمان اختلالات تخمدانی از جمله سندروم تخمدان پلی‌کیستیک و هم‌چنین افزایش میزان موفقیت در IVF و IVM استفاده گردد.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که نتایج نشان می‌دهد که مصرف گیاه شیرین‌بیان می‌تواند تأثیر مثبت بر بلوغ تخمک و تعداد فولیکول‌ها و بهبود شرایط IVM و IVF داشته باشد. مکانیسم و نحوه‌ی اثر این گیاه بر بلوغ تخمک، بارداری و سقط جنین باید مورد بررسی بیش‌تری قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری مسئولان محترم گروه زیست شناسی و دانشکده ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و پژوهشکده‌ی شمال انستیتو پاستور آمل در تامین امکانات اجرایی این طرح تشکر و قدر دانی می‌شود.

References

1. Albert-Puleo M. Fennel and anise as estrogenic agents.J. Ethnopharmacol. 1980; 2(4): 337 - 344.
2. Armanini D, Castello R, Scaroni C, Bonanni G, Faccini G, Pellati D, Bertoldo A, Fiore C, Moghetti P. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;131(1):61-67.
3. Armanini D, Mattarello MJ, Fiore C, Bonanni G, Scaroni C, Sartorato P, et al. Licorice reduces serum testosterone in healthy women. Steroids 2004;69(11-12):763–766.
4. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytother Res. 2008;22(6):709–724.
5. Bates RB, Haber WA, Setzer WN, Stessman CC. Cyclic Hemiacetals with Seven Membered Rings from an Undescribed Salacia Species from Monteverde, Costa Rica. J Nat Prod. 1999; 62(2): 340-341.
6. Brzezinski A, Adlercreutz H, Shaoul R, Rosier A, Shmueli A, Tanos V, Schenker JG. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. Menopause. 1997;4(2):89-94.
7. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. Rev Endocr Metab Disord. 2007;8(2):127-141.
8. Irani M, Sarmadi M, Bernard F,Ebrahimi pour GH, Shaker H. Leaves Antimicrobial Activity of Glycyrrhiza glabra L. Iran J Pharm Res. 2010;9(4):425–428.(persian)
9. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. Invitro maturation, fertilization, and development ofh

Archive of SID
www.SID.ir

human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. Fertil Steril 2000; 74(6): 1153-1158.

10. Liu H, Wang J, Zhou W, Wang Y, Yang L. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: an example using licorice. J Ethnopharmacol. 2013;146(3):773-793.
11. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. Obst Gyn Surv .2008; 63(1): 39–48.
12. Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Eslami B. In Vitro Antioxidant Activity ofPyrus Boissieriana, Diospyros Lotus, Eryngium Caucasicum and Froriepia Subpinnata. J Rafsenjan Univ Med Sci 2009; 8(2): 139-150 (Persian).
13. Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, et al. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. Biol Reprod. 2006;74(1):177-184.
14. Ozen T, Korkmaz H. Modulatori effect of urtica dioica L(urticacea) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxsidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. Phytomedicine. 2003;10(5):405 - 415.
15. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. J Exp Med. 1935;62(5):665-675.
16. Sharma V, Agrawal R. Glycyrrhiza glabra-a plant for the future. Mint J Pharm Med Sci. 2013;2(3):15-20.
17. Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, et al. Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with bovine serum. Theriogenology. 2006; 65(2): 374-386.
18. Tamaya T, Sato S, Okada HH. Possible mechanism of steroid action of the plant herb extracts glycyrrhizin, glycyrrhetinic acid, and paeoniflorin: inhibition by plant herb extracts of steroid protein binding in the rabbit. Am J Obstet Gynecol. 1986;155(5):1134-1139.
19. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Izrael S, Vaya J. Estrogenlikeactivity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. J Steroid Biochem Mol Biol 2001; 78(3): 291-298.
20. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. Free Radic Biol Med 1997; 23(2): 302-313.
21. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction .2001; 121(1): 51-75.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Yaginuma T, Izumi R, Yasui H, Arai T, Kawabata M. Effect of traditional herbal medicine on serum testosterone levels and its induction of regular ovulation in hyperandrogenic and oligomenorrheic women (author's transl). Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1982;34(7):939-944

Archive of SID

www.SID.ir