

Therapeutic Effects of Licorice Extract on In vitro Maturation and In vitro Fertilization in Mice Model of Polycystic Ovary Syndrome

Maryam Shamsi¹,
Vahid Nejati²,
Gholamreza Najafi³

¹ MSc in Histology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Histology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received June 15, 2015 Accepted October 5, 2015)

Abstract

Background and purpose: This study aimed at evaluating the effects of different doses of Licorice extract on in vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF).

Materials and methods: In this study 32 female adult mice were randomly assigned into four groups. Group I was the control, group II were estradiol valerate-induced PCOS mice (0.2cc), and groups III and IV were induced PCOS that received Licorice extract at 100mg/kg/day and 150 mg/kg/day dosage, respectively for 3 weeks. Afterwards, blood sample were taken and the testosterone and estradiol levels were measured. GV oocytes were isolated from ovaries and cultured in TEM₁₉₉. The oocytes (MII) were inseminated with sperm. Then, the fertilization and blastocyst stage development were investigated under inverted microscope.

Results: The serum testosterone and estradiol levels significantly decreased in treatment groups compared with PCOS mice ($P \leq 0.05$). Also, the number of oocytes, fertilization, number of two-cell and blastocysts significantly increased in treatment groups compared to the PCOS group ($P \leq 0.05$).

Conclusion: The results showed that licorice is effective on sex hormones in induced PCOS mice and also it could improve IVM and IVF in induced PCOS mice.

Keywords: PCOS, Licorice, IVM, IVF

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 113-121 (Persian).

بررسی اثرات درمانی عصاره شیرین بیان بر بلوغ و توان باروری اووسیت ها در موش های مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک

مریم شمسی^۱وحید نجاتی^۲غلامرضا نجفی^۳

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی آثار دوزهای مختلف عصاره شیرین بیان بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت ها و توان باروری آزمایشگاهی در موش های مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome) می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش سفید آزمایشگاهی به طور تصادفی انتخاب و به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. گروه یک گروه کنترل بود. گروه دو با دریافت ۰/۲ سی سی استرادیول والرایت، PCOS در آن ها برانگیخته شد. گروه سه و گروه چهار، موش های مبتلا به PCOS بودند که عصاره شیرین بیان را به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/kg/day به مدت ۳ هفته دریافت کردند. بعد از ۳ هفته از قلب موش ها خون گیری به عمل آمد و هورمون های تستوسترون و استروژن اندازه گیری شد. سپس تخمک های فاز ژرمینال و زیکول از تخمدان موش ها جدا شده و در محیط کشت TCM₁₉₉ کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت تخمک ها به متافاز II رسیده و با اسپرم لقاح داده شدند و تکامل جنینی تا مرحله بلاستوسیست در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

یافته ها: میزان هورمون های تستوسترون و استروژن در گروه های درمانی نسبت به گروه PCOS کاهش معنی دار داشت ($p < 0/05$)، هم چنین اووسیت های بالغ، درصد لقاح، جنین های دوسلولی و تعداد بلاستوسیست ها در گروه های درمانی نسبت به PCOS افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0/05$).

استنتاج: نتایج تحقیق نشان داد که شیرین بیان بر میزان هورمون های جنسی در موش های مبتلا به PCOS موثر است و هم چنین می تواند بلوغ آزمایشگاهی اووسیت ها (و توان باروری آزمایشگاهی را در موش های مبتلا به PCOS را افزایش دهد.

واژه های کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، شیرین بیان، بلوغ آزمایشگاهی اووسیت ها، توان باروری آزمایشگاهی

مقدمه

شیوع آن در مطالعات مختلف بین ۱۰ تا ۱۵ درصد گزارش شده است (۴،۲،۱). سندرم تخمدان باچاقی، نازایی، هیرسوتیسم و افزایش اندروژن و عدم تخمک گذاری

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome) از شایع ترین اختلالات اندوکراین در میان زنان می باشد، که میزان

E-mail: shams_maryam20@yahoo.com

مؤلف مسئول: مریم شمسی - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم

۱. کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار، گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه علوم آناتومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۳/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۱۳

مزمّن همراه است (۶،۵). عدم تخمک گذاری، تقریباً عامل ۴۵ درصد نازایی زنان است که بسیاری از این زنان به سندرم تخمدان پلی کیستیک مبتلا می باشند (۷). برای تحریک تخمک گذاری در افراد مبتلا به PCOS از داروها و روش های کمک تولید مثلی استفاده می شود. بلوغ تخمک در خارج از بدن (IVM: In Vitro Maturation) یکی از تکنیک های کمکی تولید مثل (ART: Assisted Reproductive Technology) می باشد که خصوصاً برای بسیاری از زنانی که قادر به بالغ کردن تخمک در داخل بدن خود نیستند و زنان مبتلا به سرطان که در معرض دوزهای بالای اشعه یا شیمی درمانی قرار می گیرند روش مناسبی است (۳،۲). کشت آزمایشگاهی تخمک IVM باعث می شود تا درصد زیادی از تخمک های مرحله ژرمینال وزیکول به مرحله متافاز II برسد (۸). هم چنین استفاده از داروهای جدید و طبیعی جهت درمان این سندرم ضروری است.

Glycyrrhiza glabra (گیاه شیرین بیان) از مهم ترین گیاهان دارویی است که عضو خانواده لگومیناسه می باشد که از ۴۰۰۰ سال پیش برای درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شده است (۳). Takahashi و Sakamoto اثرات شیرین بیان بر روی هورمون تستوسترون را مورد بررسی قرار دادند (۱۰،۹). نظر به اهمیت باروری و نیاز به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان در افراد مبتلا به PCOS، این مطالعه به منظور بررسی اثر درمانی شیرین بیان بر میزان سطح سرمی تستوسترون و استروژن و هم چنین بلوغ تخمک در خارج از بدن (IVM) و توان باروری آزمایشگاهی (IVF: In Vitro Fertilization) در موش های مبتلا به PCOS انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۳۲ سرموش سوری نژاد NMRI ماده نابالغ با وزن حدود 1 ± 25 به صورت تصادفی انتخاب شدند. موش ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در حرارت ۲۲ تا ۲۵ درجه با دسترسی آزاد به آب

و غذا نگهداری شدند. برای القاء فنوتیپ سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) روش های القاء هورمونی و غیر هورمونی متنوعی از جمله هورمون تستوسترون، دهیدرواپی اندروسترون (DHA)، آدرنو کورتیکوتروپین (ACTH)، استرادیول والرایت (EV) و استفاده از نور طولانی مدت وجود دارد (۱۴-۱۱). استرادیول والرایت به دلیل تجویز ماهیچه ای و تک دوز بودنش نسبت به بقیه داروها ارجحیت دارد. به همین منظور در این تحقیق از استرادیول والرایت (شرکت ابوریحان، ایران) استفاده گردید. سیکل جنسی همه موش ها با تهیه اسمیر واژنی طی ۱۴ روز تعیین شد و سپس به طور مساوی به ۴ گروه تقسیم شدند:

گروه یک به عنوان گروه کنترل: موش ها هیچ دارویی دریافت نکردند. گروه دوم: موش هایی که PCOS در آنها القاء شد و هیچ دارویی دریافت نکردند (کنترل مثبت). گروه سوم: موش هایی که PCOS در آنها القاء شد و روزانه 100 mg/kg عصاره شیرین بیان به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم: موش هایی که PCOS در آنها القاء شد و روزانه 150 mg/kg عصاره شیرین بیان به صورت خوراکی دریافت کردند. در این مطالعه عصاره شیرین بیان توسط مرکز تحقیقات فارماکولوژی دانشگاه ارومیه تهیه شد. طول دوره تیمار در این حیوانات ۲۱ روز بود.

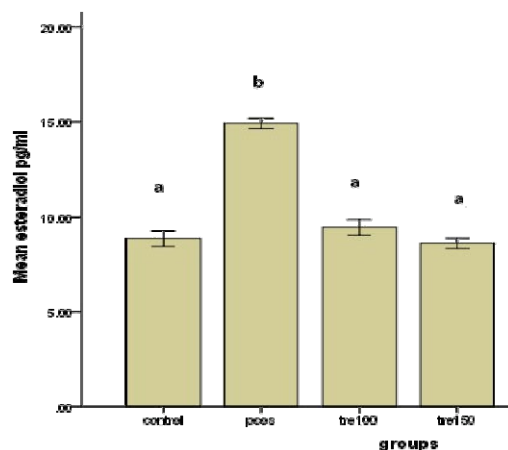
جهت تهیه اووسیت از تخمدان در موش های ماده، $7/5 \text{ IU PMSG}$ (شرکت فولیگون، هلند) به طریق درون صفاقی تزریق شد و ۴۸ ساعت بعد تخمک گیری از فولیکول آغاز شد. در این مطالعه موش های گروه آزمایشی توسط جابه جایی مهره های گردنی آسان کشی شده و سپس با خونگیری از قلب موش ها، میزان هورمون های استروژن و تستوسترون توسط کیت الایزا (دیآپلاس، آمریکا) طبق دستور شرکت سازنده اندازه گیری شد. تخمدان ها در شرایط استریل از بدن خارج و به درون قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت α -MEM حاوی ۵ درصد (FCS: Fetal Calf Serum) (سیگما، آلمان) منتقل شدند. چربی های اضافی اطراف تخمدان با قطرات

مجاورت اسپرم‌ها به مدت ۴ تا ۶ ساعت انکوبه شدند. در این آزمایش تعداد اووسیت‌های نابالغی (GV) که به مرحله متافاز II (بلوغ) رسیدند، درصد اووسیت‌های لقاح یافته، تعداد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیت‌ها بررسی شد (تصویر شماره ۲). محاسبه آماری با استفاده از نرم‌افزاری آماری SPSS نسخه ۱۹ انجام شد و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey استفاده شد ($p < 0.05$) به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

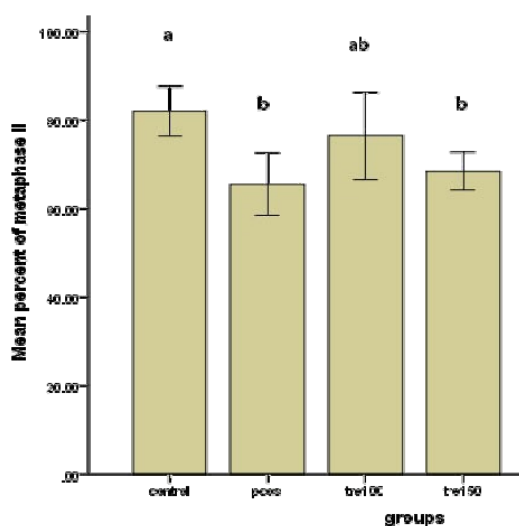
یافته‌ها

بعد از القاء سندروم تخمدان پلی کیستیک در گروه‌های آزمایشی، بررسی‌های آماری بین گروه‌های مختلف نشان داد که میزان تستوسترون در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است و در گروه‌های PCOS تحت تیمار با عصاره شیرین بیان میزان تستوسترون نسبت به گروه PCOS کاهش معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). در آنالیز آماری بین گروه‌های آزمایشی، استرادیول در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت. در گروه‌هایی که تحت تیمار با عصاره شیرین بیان قرار گرفتند، میزان استرادیول نسبت به گروه PCOS کاهش یافت ($p < 0.05$)، تعداد اووسیت‌های نابالغی که به مرحله متافاز II رسیدند در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار یافت ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۳). نمودار شماره ۴، درصد اووسیت‌های لقاح یافته را در گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد، که در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار دارد. در بقیه گروه‌های تیمار شده با عصاره شیرین بیان نسبت به گروه PCOS افزایش معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$). طبق نمودار شماره ۵، جنین‌های دوسلولی در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار دارد. در گروه‌های تیمار با عصاره شیرین بیان تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد ($p < 0.05$). در نمودار شماره ۶، درصد بلاستوسیت‌ها در گروه PCOS نسبت به گروه

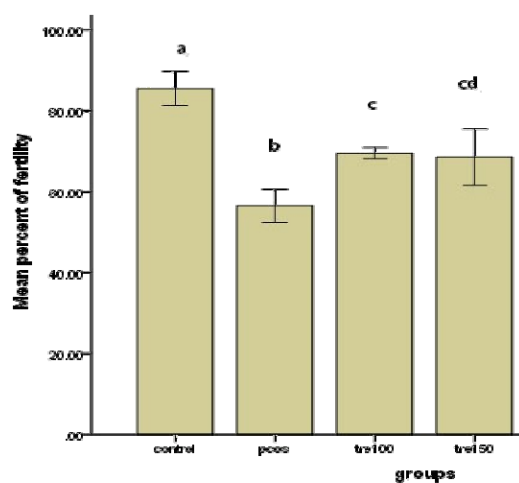
۵۰۰ میکرولیتری انتقال داده شد. تخمدان‌ها با استفاده از سرنگ‌های انسولین تشریح و تخمک‌های نارس حاوی ژرمینال و زیگول همراه با سلول‌های گرانولوزا اطراف آن برداشته شد (تصویر شماره ۱). تخمک‌های نارس در محیط بلوغ α -MEM حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر rFSH (سیگما، آلمان)، ۷/۵ واحد در میلی‌لیتر HCG: Human Chorionic Gonadotropin (سیگما، آلمان)، ۵ درصد FCS قرار داده شد. برای بلوغ آزمایشگاهی اووسیت از دو نوع محیط کشت با نام‌های TCM₁₉₉ و (TCM₁₉₉: Tissue culture medium 199) HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine- حاوی HTCM₁₉₉ (N'-2-Ethanesulfonic Acid) که با نام (GIBCO, UK) معروف می‌باشد، استفاده شد. تخمک‌های کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفت و تغییرات مورفولوژیک در هسته با آزاد شدن اولین جسم قطبی (متافاز II) که به عنوان معیاری برای بلوغ هسته‌ای تخمک‌های نابالغ محسوب می‌شود، مورد توجه قرار گرفت. تخمک‌هایی که اولین جسم قطبی را آزاد کردند، برای لقاح آزمایشی استفاده شدند. ۱۸ ساعت بعد از بلوغ آزمایشگاهی، تخمک‌های بالغ در محیط لقاح شستشو شدند و با اسپرم‌های ظرفیت یافته از موش انکوبه شدند. برای تهیه اسپرم از موش‌های نر ۸ تا ۱۲ هفته‌ای استفاده شد. موش‌نر به روش جابه‌جایی مهره‌های گردن آسان‌کشی شد، سپس دم اپیدیدیم جدا و داخل پتریدیش ۲ سانتی‌متری حاوی محیط کشت (HTF: Human Tubular Fluid) (سیگما، آلمان)، با ترکیب ۴mg/ml (BSA: Bovine Serum Albumin)، که قبلاً جهت تعادل داخل انکوباتور قرار داده شده بود، قرار گرفت. پس از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران، برای خروج اسپرم‌ها در داخل انکوباتور CO₂ گذاشته شد. جهت ظرفیت یابی، اسپرم‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اووسیت‌های بالغ در قطرات ۵۰ میکرو لیتر از محیط لقاح پوشیده شده با روغن در



نمودار شماره ۲: میانگین استرادیول در گروه های مختلف آزمایشی (بر حسب pg/ml)



نمودار شماره ۳: تعداد اووسیت های نابالغی (GV) که به مرحله متافاز II رسیدند

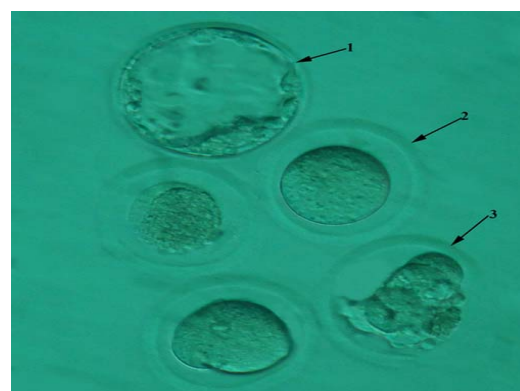


نمودار شماره ۴: نتایج حاصل از درصد اووسیت های لقاح یافته

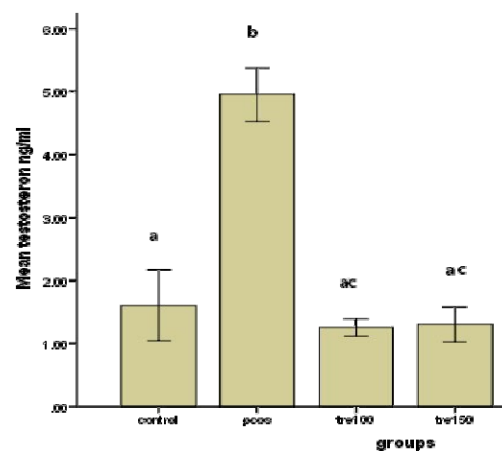
کنترل کاهش معنی دار وجود دارد. هم چنین در گروه های تحت تیمار عصاره شیرین بیان نسبت به گروه PCOS افزایش معنی دار وجود دارد ($p < 0.05$).



تصویر شماره ۱: اووسیت نابالغ به همراه توده کومولوسی گروه کنترل



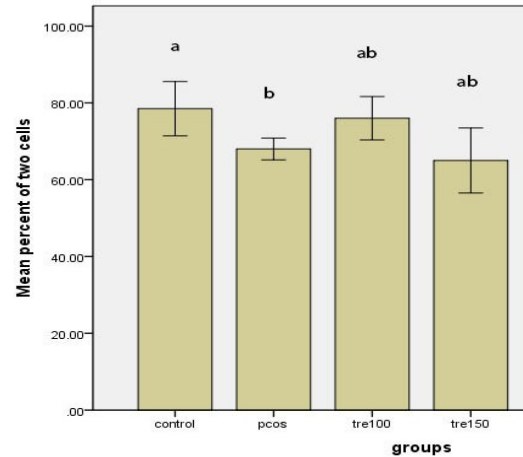
تصویر شماره ۲: در این تصویر در گروه PCOS یک جنین در مرحله بلاستوسیست (۱)، یک اووسیت نابارور (۲) و یک جنین اررست شده (۳) در مرحله ۲ سلولی دیده می شود



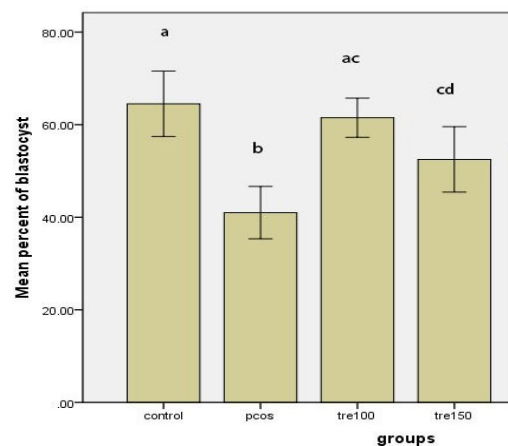
نمودار شماره ۱: میانگین تستوسترون در گروه های مختلف آزمایشی (بر حسب ng/ml)

بیماران مبتلا به PCOS، نسبت آندروستندیون فولیکولی به استرادیول بالا می‌باشد (۲۰، ۱۹). در تخمدان‌های پلی کیستیک مقادیر فراوانی آندروستندیون از لایه تک داخلی ترشح می‌شود که با تبدیل شدن به تستوسترون سطح آن افزایش می‌یابد، از طرفی در زنان PCOS بخشی از تستوسترون در ارتباط با غده آدرنال می‌باشد (۲۱). افزایش آندروژن داخل تخمدانی نقش قابل ملاحظه‌ای در کاهش روند تخمک گذاری دارد (۲۰، ۱۹). هم چنین یکی از علایم بارز و مهم این سندرم افزایش سطح استرادیول آزاد می‌باشد (۲۴). در تخمدان‌های مبتلا به PCOS، سلول‌های موجود در لایه گرانولوزا مقادیر پایین تری استروژن نسبت به سلول‌های گرانولوزای تخمدان‌های سالم ترشح می‌کنند. افزایش هورمون استروژن سرمی در PCOS، به علت تبدیل آندروژن به استروژن در خارج از گنادها می‌باشد (۲۵). استروژن در پیشبرد رشد و تکامل فولیکول‌ها نقش دارد و این مسئله وابسته به گیرنده‌های استروژن است، تستوسترون حساسیت سلول‌های گرانولوزا را به استروژن از بین برده یا کاهش می‌دهد و با این مکانیسم، گیرنده‌های استروژن در سلول‌های گرانولوزا کاهش می‌یابند (۲۷).

Gonzalez و همکارانش گزارش دادند که میزان رادیکال‌های آزاد مایع فولیکولی افراد مبتلا به PCOS بیش تر از افراد سالم است (۲۳). بنابراین به نظر می‌رسد که رادیکال‌های آزاد موجود در مایع فولیکولی یکی از عوامل عدم تخمک گذاری در افراد مبتلا به این سندرم می‌باشد. PCOS با اختلالات هورمونی پیچیده‌ای همراه است که با عدم تخمک گذاری مزمن و کیست‌های تخمدانی توصیف می‌شود (۱۳). متدوال‌ترین داروها برای القاء تخمک گذاری در بیماران مبتلا به PCOS کلومیفن سترات و گنادوتروپین‌ها می‌باشد (۱۴). 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



نمودار شماره ۵: نتایج حاصل از جنین‌های دو سلولی



نمودار شماره ۶: مقایسه میانگین درصد بلاستوسیت‌ها

بحث

نتایج مطالعه حاکی از آن است که استفاده از استرادیول والرایت جهت القاء سندروم تخمدان پلی کیستیک، باعث افزایش معنی‌دار هورمون‌های استرادیول و تستوسترون در سرم خون موش‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با گروه کنترل گردید. از سوی دیگر پس از دریافت عصاره شیرین بیان، میزان هورمون استرادیول و تستوسترون در گروه تیمار (تجربی) به صورت معنی‌دار نسبت به گروه PCOS کاهش نشان داد. این امر با نتایج تحقیق Sakamoto و Takahashi همسو می‌باشد (۱۲، ۹). به علت نقص Aromataization و موتاسیون ژن P450 آروماتاز در

مورد بررسی قرار گرفت. شواهد متعددی در خصوص اثرات این گیاه به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی و فیتواستروژنی در افراد مبتلا به PCOS وجود دارد (۱۶، ۱۵). هم چنین، یکی دیگر از روش های مناسب جهت مطالعه اووسیت ها و تکامل اولیه جنین برای بیماران با سندروم تخمدان پلی کیستیک، بلوغ اووسیت های پستانداران در خارج از بدن می باشد. برای کاهش اثرات جانبی تحریکات گنادوتروپین ها لقاح In vitro از تکنیک بلوغ آزمایشگاهی اووسیت (IVM) استفاده می شود (۱۸، ۱۷). در این تحقیق بررسی اثر عصاره شیرین بیان بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت هاو لقاح آزمایشگاهی اووسیت ها صورت گرفت. براساس نتایج به دست آمده مشخص شد، تعداد اووسیت های نابالغی که به مرحله متافاز II رسیدند در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار داشت. هم چنین درصد اووسیت های لقاح یافته و جنین های دوسلولی و درصد بلاستوسیست ها در گروه PCOS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار داشت و این در حالی بود که گروه تحت تیمار با عصاره شیرین بیان نسبت به گروه PCOS افزایش معنی دار دیده شد. یافته های Dumesic و همکارانش مشاهدات ما را تایید می کند. آن ها نشان دادند، میزان زیاد تستوسترون باعث کاهش میزان IVM، لقاح و تکامل جنینی می شود (۱۰). گلیسیریزین یک ترکیب تریتروپنوئید است که باعث شیرینی ریشه شیرین بیان می شود.

Armanini و همکارانش پیشنهاد کردند که گلیسیریزین یا متابولیت های آن بر روی آنزیم بتا- هیدروکسی استروئید دهیدروژناز که باعث تبدیل ۱۷- هیدروکسی پروژسترون به آندروستندیون می شود، عمل می کند و به طور موثر تستوسترون را کاهش می دهد (۲۶). هم چنین گلابریدین و گلابرن در شیرین بیان فعالیت شبه استروژنی دارند که منجر به افزایش فعالیت آروماتازی می شوند (۲۲). مطالعات قبلی نشان داده اند، عصاره شیرین بیان در کاهش تستوسترون و القاء تنظیم تخمک گذاری نقش به سزایی دارد. هم چنین در پژوهش دیگری که Dumesic و همکارانش انجام دادند، شیرین بیان با توجه به خواص آنتی اکسیدانی که دارد، باعث کاهش میزان رادیکال های آزاد در افراد مبتلا به PCOS می شود (۲۲). به طور کلی این تحقیق نشان داد ترکیبات موجود در عصاره شیرین بیان که دارای خواص آنتی اکسیدانی و شبه استروژنی می باشند باعث افزایش میزان IVM، لقاح و تکامل جنینی می شود. با توجه به یافته های این تحقیق می توان نتیجه گیری کرد که شیرین بیان به دلیل داشتن خواص فیتواستروژنی و آنتی اکسیدانی باعث کاهش تستوسترون و استروژن می گردد. هم چنین میزان باروری به دنبال استفاده شیرین بیان افزایش می یابد. از این رو می توان پیشنهاد کرد، از شیرین بیان برای درمان اختلالات تخمدانی از جمله سندروم تخمدان پلی کیستیک و هم چنین افزایش میزان موفقیت در IVF و IVM استفاده گردد.

References

- Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collect from stimulated cycles. Fertile Sterill 2000; 74(6): 1153-1158.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121(1): 51-75.
- 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.
- Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Abbott DH. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. J Clin

- Endocrinol Metab 2005; 90(12): 6630-6637.
5. Amer SAK. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management of related infertility. Obstet Gynaecol Reprod Med 2009; 19(10): 263-270.
 6. Dunaif A. Drug insight: Insulin sensitizing drugs in the treatment of polycystic ovary syndrome--a reappraisal. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2008; 4(4): 272-283.
 7. Fleming R, Hopkinson ZE, Wallace AM, Greere IA, Sattar N. Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(2): 569-574.
 8. 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. Theriology 2006; 65(2): 374-386.
 9. Takahashi K, Yoshino K, Shirai T, Nishigaki A, Araki Y, Kitao M. Effect of a traditional herbal medicine (Shakuyaku-kanzo-to) on testosterone secretion in patients with polycystic ovary syndrome detected by ultrasound. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 1988; 40(6): 789-792.
 10. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. Obst Gyn Surv 2008; 63(1): 39-48.
 11. Baravelle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. The role of ACTH in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome in rats: hormonal profiles and ovarian morphology. Physiol Res 2007; 56(1): 67-78.
 12. Sakamoto K, Wakabayashi K. Inhibitory effect of glycyrrhetic acid on testosterone production in rat gonads. Endocrinol Jpn 1988; 35(2):333-342.
 13. Allahbadia GN, Merchantb R. Polycystic ovary syndrome and impact on health. Middle East Fertility Society Journal 2011; 16(1): 19-37.
 14. Brock B, Smidt K, Ovesen P, Schmitz O, Rungby J. Is metformin therapy for Polycystic Ovary Syndrome safe during pregnancy? Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology 2005; 96(6): 410-412.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121(1): 51-75.
 18. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. Invitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. Fertil Steril 2000; 74(6): 1153-1158.
 19. Patua MB, Tekin S, Spencer TE, Hansen PJ. Action of progesterone on uterine immunosuppression and endometrial gland development in the uterine gland Knockout (UGKO) ewe. Mol Reprod Dev 2005; 71(3): 347-357.
 20. Peters H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta endocrinol (Copenh) 1996; 62(1): 98-116.

21. Aaltonen J, Laitinen MP, Voujolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8): 2744-2750.
22. Tamaya T, Sato S, Okdan HH. Possible mechanism of steroid action of the plant herb extracts glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and paeoniflorin: inhibition by plant herb extracts of steroid protein banding in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155(5): 1134-1139.
23. Gonzalez F, Thusu K, Abdel-Rahman E, Prabhala A, Tomani M, Dandona P. Elevated serum levels of tumor necrosis factor alpha in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48(4): 437-441.
24. Jones RE, Duvall D, Guillette JR LJ. Rat ovarian mast cells: Distribution and cyclic changes. *Anat Rec* 1980; 197(4): 489-493.
25. Stadtmauer LA, Toma SK, Riehl RM, Talbert LM. Metformin treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insulin-like growth factor. *Fertility and Sterility* 2001; 75(3): 505-509.
26. Armanini D, Castello R, Scaroni C, Bonanni G, Faccini G, Pellati D, et al. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2007; 131(1): 61-67.
27. Batth BK, Parshad RK. Mast cell dynamics in the house rat (*Rattus rattus*) ovary during estrus cycle, pregnancy and lactation. *Eur J Morphol* 2000; 38(1): 17-23.