

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

Zakieh Esmailii¹,
Nasim hayati roodbari²,
Simin mohammady gorji³,
Kazem parivar⁴

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

بررسی اثر عصاره گیاه شیرین بیان *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 شیرین بیان 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 به صورت 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 به صورت 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 به صورت گاوآژ و به موش‌های سه گروه تجربی ۱ و ۲ و ۳ در طی ۷ روز، روزانه به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره ی شیرین بیان از راه دهان به آن‌ها گاوآژ شد. سپس موش‌های در روز ۸ تشریح شدند. تخمدان‌های آن‌ها جدا شده و تخمک‌ها 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 شیرین بیان، 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.

واژه‌های کلیدی: گیاه شیرین بیان، موش نژاد NMRI، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، لقاح آزمایشگاهی تخمک

مقدمه

مسکن سرفه، ضدالتهاب، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد پلاکت، ضد ویروسی (هپاتیت) استفاده می‌شود (Liu H et al., ۲۰۱۳). (شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra*) از خانواده‌ی نخودیان (Liguminoceae) است.

شیرین بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که در هر دو فرهنگ شرقی و غربی استفاده‌ی چندین هزار ساله دارد. (Armani D ۲۰۱۰) (Irani M et al., ۲۰۰۴) (به علاوه در طب سنتی چین به عنوان یک

Email: nasimhayati@yahoo.com

مؤلف مسئول: نسیم حیاتی رودباری - تهران، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ایران

۴. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی 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

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 عصاره گیاه شیرین بیان را بر روی بلوغ تخمک و باروری، مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

روش عصاره گیری

ریشه گیاه شیرین بیان از انستیتو پاستور آمل خریداری شد. برای عصاره گیری 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 عصاره گیری، از تبخیر حلال جلوگیری شد. ظرف مورد نظر با فویل کاملاً پوشانده شد. عصاره گیری 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 عصاره گیری 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 ۰/۰۰۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن عصاره‌ی شیرین بیان در ۰/۵ سی سی آب مقطر حاصل شد.

بررسی بافت شناسی

تحقیق حاضر با استفاده از موش‌های ماده نژاد NMRI و سن ۸-۶ هفته انجام شد. موش‌های نابالغ به مدت ۶-۷ روز با استفاده از عصاره شیرین بیان گاوآز

عصاره‌ی شیرین بیان به طور گسترده‌ای در صنایع دارویی و شیرینی‌سازی به دلیل حضور glycyrrhizin استفاده می‌شود (Nitalikar MM et al., 2010). گزارش‌ها حاکی از آن است که این گیاه حاوی ترکیبات دارویی و طبعی مانند glycyrrhizin، اسید glycyrrhetic، globrin A & B، استرول‌های تری ترپنی، ساپونین و ایزوفلانوئید هست (Sharma V et al., 2013). شیرین بیان 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 ژرینال وزیکول بتوانند به مرحله‌ی متافاز دو برسند (Suzuki M et al; 2006). سابقه‌ی 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 شیرین بیان در بین مردم از گذشته تاکنون رواج بسیار زیادی پیدا کرده

شدند. جهت تحریک تخمک‌گذاری از هورمون PMSG به میزان ۷/۵ واحد بین‌المللی برای هر موش به وسیله سرنگ انسولین به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG، موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند (موش‌های گروه کنترل، بدون دریافت هیچ ماده‌ی خاصی تشریح شدند). برای تشریح موش‌ها، سطح بدن آن‌ها به وسیله‌ی پنبه‌ی الکلی ضدعفونی گردیده، پوست بدن و پرده‌ی صفاق بریده شد، سپس بافت‌های تخمدان چپ و راست و شاخ‌های رحم چپ و راست به وسیله‌ی قیچی و پنس و اسکالپل جدا گردید و در آب مقطر شستشو داده شد. بعد از آن در سرم فیزیولوژی بافت‌های اضافی و چربی جدا شد. هر کدام از بافت‌ها در ظرف‌های جداگانه در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از گذشت ۶-۴ ساعت، فرمالین از ظرف‌ها خالی گردید و به جای آن الکل ۷۰ درصد جایگزین شد و بافت‌ها تا زمان شروع مراحل الکل‌دهی در الکل ۷۰ درصد باقی ماندند. تخمک‌های نارس گرفته شده از موش در محیط رسیدگی شامل α -MEM- حاوی FBS، rhFSH، hCG و Pen-strep قرار داده شد. سپس تخمک‌های بالغ شده بعد از ۲۴ ساعت در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند. سپس بافت‌ها، الکل‌دهی و قالب‌گیری شدند و بعد از برش‌دهی، تهیه‌ی لام و رنگ آمیزی با H&E توسط استریومیکروسکوپ بررسی شدند.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک

تخمک‌های GV به شکل کروی، سیتوپلاسم روشن، قشر شفاف زوناپلوسیدا با فضای پری ویتلینی مناسب به عنوان تخمک سالم در ۵ گروه انتخاب و کشت داده شدند. محیط بلوغ که برای گروه کنترل شامل α -MEM، FBS، rhFSH، hCG و Pen-strep می‌باشد و برای گروه شم، تخمک نارس گرفته شده از موش‌های ماده با آب خوراکی به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر،

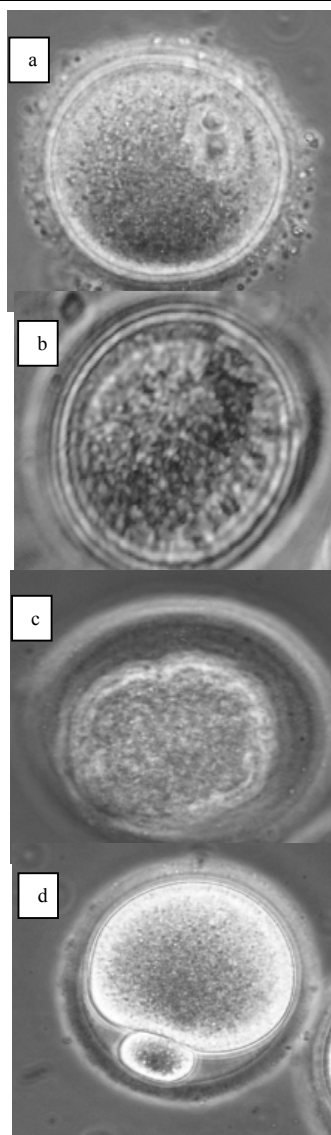
بدون عصاره به هر موش به مدت ۷ روز گاوآژ شد و سپس در محیط بلوغ قرار داده شد و به ترتیب برای گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ تخمک نارس گرفته شده به موش‌های ماده با عصاره به غلظت ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به هر موش گاوآژ شد و سپس در محیط رسیدگی قرار داده شد. تخمک‌های هر گروه در انکوباتور CO2 قرار داده شدند. بلوغ تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس، ۲۴ ساعت بعد در گروه‌ها بررسی شد. از بین تخمک‌های موجود در هر گروه بسته به شرایط آزمایشی به کار رفته در مطالعه، در تعدادی از تخمک‌ها نشانی از علائم شروع میوز دیده شد (GV). در تعدادی هسته‌شان شکسته شد (GVBD) و تعدادی بالغ شدند (MII). هم‌چنین در برخی از گروه‌ها تعدادی از تخمک‌ها، تخریب شدند (Deg). از تخمک‌هایی که دارای جسم قطبی بودند، جهت استفاده در لقاح 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 بلوغ اسپرم با استفاده از پتری دیش ۳۵ میلی‌متری جهت IVF با قطرات ۳۰ میکرولیتری در این ظرف کشت قطره‌گذاری شدند. سپس به میزان کافی از روغن معدنی، برای جلوگیری از خشک شدن محیط اضافه شد. محیط IVF برای موش‌های نر حاوی T6، FBS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین ساخته شد. پس از نخاعی کردن، دم اپیدیدیم آن‌ها را جدا کرده، اسپرم‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 به منظور ظرفیت‌گیری اسپرم قرار داده شد. بعد از اتمام یک ساعت، محیط حاوی اسپرم از انکوباتور خارج شد. اسپرم‌های فعال با تحرک بالا به کناره‌های قطره مهاجرت کردند. اسپرم‌های فعال به کمک پیبت از کناره‌های قطره برداشته شد و به محیط

جدول شماره ۱: تأثیر سطوح تیمار بر میانگین تخمک‌های

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				
گروه تجربی ۵۰۰	۱۰۰	۱۱	۱۳	۶۲
	۱۳۳	۱۰	۲۶	۸۲



شکل شماره ۱: تصویر میکروسکوپ اینورت از a: تخمک نارس. d. GVBD. c. MII. b. GV; تخمک دژنره. x10

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 به منظور تشکیل جنین دو سلولی و چهار سلولی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.

آنالیز داده‌ها

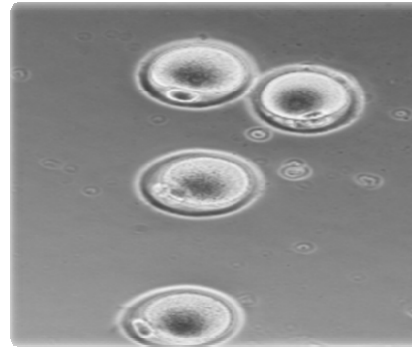
برای بررسی داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics ver ۲۲ و آنالیز واریانس یک‌طرفه ONE WAY ANOVA و آزمون Tukey استفاده شد و هیستوگرام‌های مربوطه توسط نرم‌افزار Microsoft Excel ۲۰۱۳ رسم گردید. در تمامی مراحل $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در طرح تحقیقاتی حاضر مشاهده شد عصاره گیاه شیرین بیان 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 میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن از عصاره گیاه شیرین بیان در تخمک نابالغ می‌تواند منجر به تکامل اووسیت‌های مرحله وزیکول زاینده به مرحله متافاز II شود (شکل شماره ۲)، اما در این تحقیق، گیاه شیرین بیان 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).

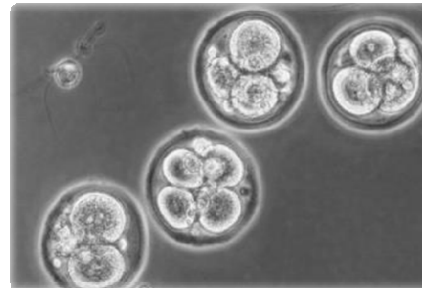
نتایج حاصل از بررسی جنین شناسی

نتایج حاصل از بررسی بافت تخمدان نشان می‌دهد که گاوآژ 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 ۱-۴ فتومیکروگراف مقطع تخمدان گروه کنترل مشاهده می‌گردد که در آن تعداد فولیکول‌ها بسیار کم است.



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپ اینورت از تخمک بالغ شده‌ی حاصل از عصاره‌ی شیرین بیان. $\times 10$

نتایج حاصل از IVF، ۴۸ ساعت بعد از لقاح نشان داد که دوز ۰/۰۰۵ میلی‌گرم 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).

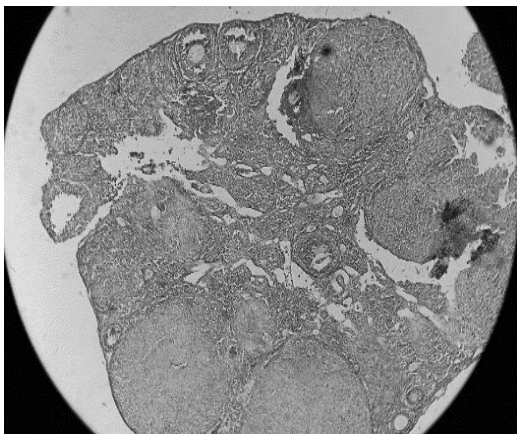


شکل شماره ۳: تصویر میکروسکوپ اینورت از تشکیل جنین ۲ سلولی و جنین ۴ سلولی گروه تجربی سه در زیر میکروسکوپ $\times 10$

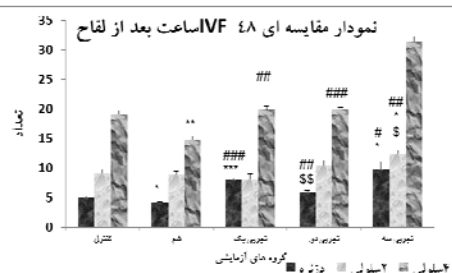


شکل شماره ۱-۴: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه کنترل با بزرگ‌نمایی $\times 40$ با رنگ آمیزی H&E (A) فولیکول اولیه / B: فولیکول ثانویه / C: فولیکول گراف / D: جسم زرد

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

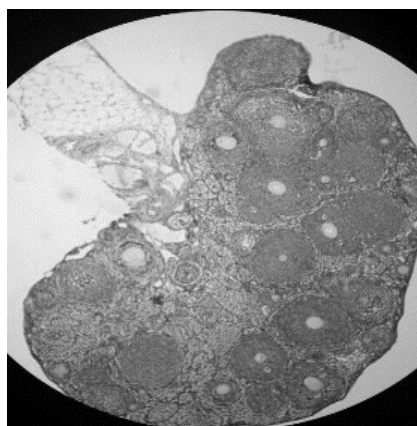


شکل شماره ۲-۴: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه شم با بزرگ‌نمایی $\times 40$ با رنگ آمیزی H&E (A: فولیکول اولیه / B: فولیکول ثانویه / C: فولیکول گراف / D: جسم زرد)



نمودار شماره ۱: نمودار مقایسه‌ی نتایج IVF، ۴۸ ساعت بعد در گروه شم و تجربی ۱، ۲، ۳ و نسبت به گروه کنترل $P < 0.05$ در مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل $P < 0.01$ در مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل $P < 0.001$ در مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل

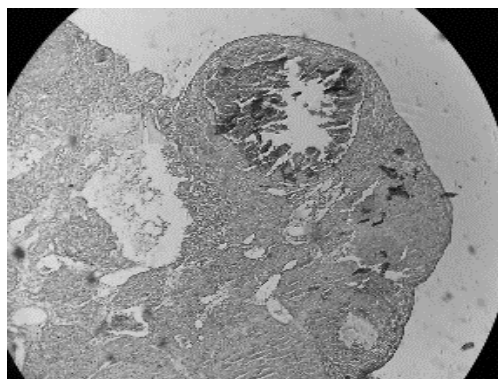
(A: فولیکول اولیه / B: فولیکول ثانویه / C: فولیکول گراف /
D: جسم زرد)
تصویر شماره ۴-۵، فتومیکروگراف مقطع تخمدان
گروه تجربی سوم با دوز ۵۰۰ میکرولیتر شیرین بیان
است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تعداد انواع
فولیکول‌های تخمدانی در این گروه بسیار افزایش یافته
است.



شکل شماره ۵-۵: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه
تجربی دو با بزرگ‌نمایی ۱۰× با رنگ آمیزی H&E
(A: فولیکول اولیه / B: فولیکول ثانویه / C: فولیکول گراف /
D: جسم زرد)

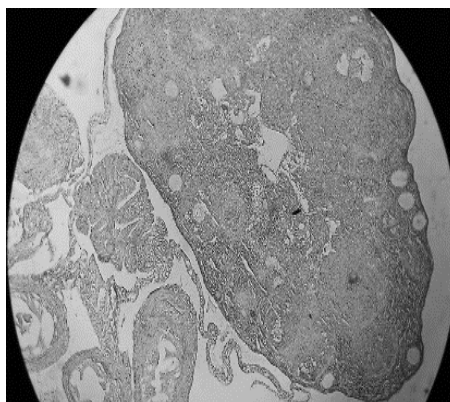
شکل شماره ۴: فتومیکروگراف‌های مقاطع
میکروسکوپی تخمدان با بزرگ‌نمایی ۴۰× رنگ آمیزی
هماتوکسین اتوزین در گروه‌های کنترل (a)، شم (b)،
تجربی یک (c)، دو (d) و سه (e) با دوز ۱۰۰، ۲۰۰
و ۵۰۰ میکرولیتر شیرین بیان است.

در تصویر شماره ۳-۴ فتومیکروگرافی از مقطع
تخمدان گروه تجربی اول با دوز ۱۰۰ میکرولیتر
شیرین بیان، تعداد فولیکول‌های تخمدان رو به افزایش
است.



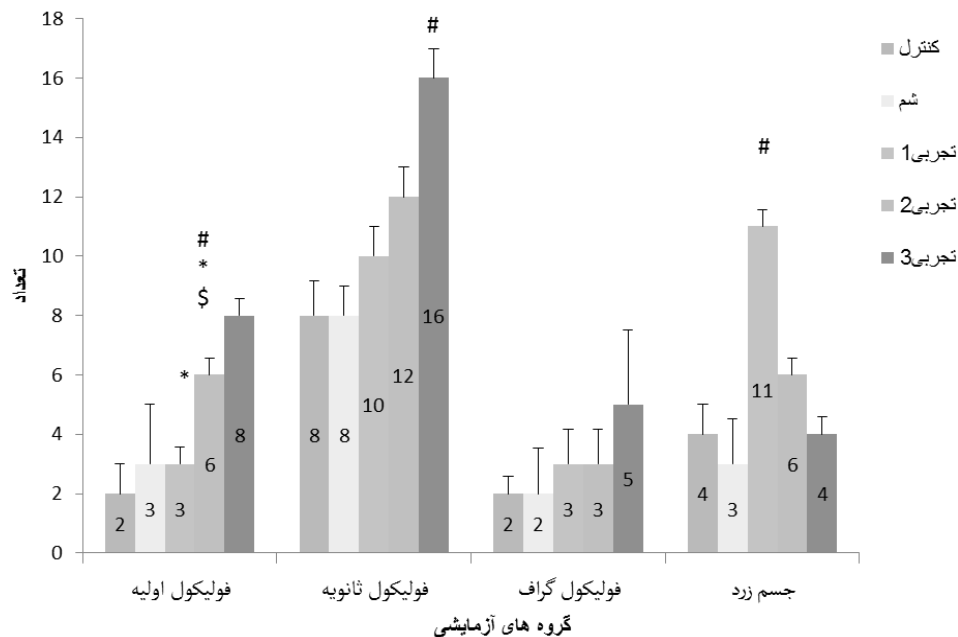
شکل شماره ۳-۴: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه
تجربی یک با بزرگ‌نمایی ۴۰× با رنگ آمیزی H&E
(A: فولیکول اولیه / B: فولیکول ثانویه / C: فولیکول گراف /
D: جسم زرد)

در تصویر شماره ۴-۴، فتومیکروگرافی از مقطع
تخمدان گروه تجربی دوم با دوز ۲۰۰ میکرولیتر شیرین
بیان، تعداد فولیکول‌های تخمدان هم‌چنان در حال
افزایش است.



شکل شماره ۴-۴: تصویر فتومیکروگراف بافت تخمدان گروه
تجربی دو با بزرگ‌نمایی ۴۰× با رنگ آمیزی H&E

نمودار مقایسه ای نتیجه ی بافت شناسی



نمودار شماره ۲: نمودار مقایسه ای نتایج بافت شناسی تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل و شم
* P<0.05 در مقایسه گروه ها 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 مدل های انسانی پرداخته و تاثیر آن ها بر اندام های مختلف از جمله مغز، کلیه، پوست، ریه و غیره را مورد بررسی قرار داده اند. 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 پژوهش هایی می پردازیم که تاثیرات دارویی را بر بلوغ تخمک ها مورد بررسی قرار داده اند.

شیرین بیان به علت ارزش اقتصادی و دارویی که برای انسان دارد، بسیار مفید می باشد. این دانه از لحاظ

ویتامین ها و لیگان های آنتی اکسیدانی (فیتواستروژن ها) غنی است و می تواند پتانسیل باروری را بهبود بخشد. Brzezinski و همکاران در سال ۱۹۹۷ طی مطالعه ای که در آن از رژیم غذایی غنی شده از دانه کتان و سویا، استفاده کردند، پی بردند که این گیاهان می توانند سبب بهبود باروری شوند. آن ها دلیل تاثیر این رژیم غذایی بر بهبود باروری را مرتبط با فیتواستروژن های موجود در دانه کتان و سویا دانسته اند (Brzezinski, 1997). در تحقیق حاضر، فیتواستروژن موجود در شیرین بیان سبب بهبود باروری شده است. گیاه گزنه منبع قابل دسترسی از آنتی اکسیدان های طبیعی می باشد، بنابراین بلوغ تخمک را افزایش می دهد (Ozen, 2003). هم چنین محققان پی بردند که گیاه دیو سپروس لوتوس دارای اثرات آنتی اکسیدانی می باشد. این گیاه به دلیل داشتن مقادیر قابل توجهی آنتی اکسیدان می تواند بر روند بلوغ تخمک تاثیر گذار باشد (Nabavi SM et al; 2009).

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 بلاستوسیت‌ها 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 گلیسریریزین یک ترکیب تری‌ترپنوئید است که باعث شیرینی ریشه شیرین بیان می‌شود. هم‌چنین در پژوهش دیگری که Dumesic و همکارانش انجام دادند، شیرین بیان با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی که دارد، باعث کاهش میزان رادیکال‌های آزاد در افراد مبتلا به PCOS شد (Tamaya T,1986).

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

این تحقیق نشان دادیم که شیرین بیان 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 تخمک‌گذاری، باعث افزایش معنی‌دار هورمون‌های استرادیول در موش‌های نابالغ گروه تجربی یک و دو و سه در مقایسه با گروه کنترل گردید. این امر با نتایج مطالعه Dumesic و همکارانش همسو می‌باشد. گلیسریریزین یک ترکیب تری‌ترپنوئید است که باعث شیرینی ریشه شیرین بیان می‌شود. Armanini و همکارانش عنوان کردند که گلیسریریزین یا متابولیک‌های آن بر روی آنزیم بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز که باعث تبدیل 17-هیدروکسی پروژسترون به آندروستندیون می‌شود، عمل می‌کند و به‌طور مؤثر تستوسترون را کاهش می‌دهد (Armanini D et al;2007). هم‌چنین گلابریدین و گلابرن در شیرین بیان، 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، شیرین بیان 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. شیرین بیان 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 آنتی‌اکسیدانی و فیتواستروژنی در طول IVM باشد. گیاه شیرین بیان نیز حاوی آنتی‌اکسیدان و ویتامین A, B, C, D و فلاونوئیدها می‌باشد که به‌نوبه‌ی خود سبب

بر بلوغ تخمک و تعداد فولیکول‌ها و بهبود شرایط IVF و IVM 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 زیست‌شناسی و دانشکده‌ی 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.

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 پیش‌رو نشان داد مصرف شیرین‌بیان در دوز مناسب می‌تواند در بهبود باروری موثر باشد. از این رو می‌توان پیشنهاد کرد از شیرین‌بیان به دلیل 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

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. In vitro maturation, fertilization, and development of

- 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 of *Pyrus 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, antioxidant 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, glycyrrhetic 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. Estrogenlike activity 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.

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