

## اثر گلیسیریزیک اسید بر گنادوتروپین‌ها، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک

سید دامون صدوقی<sup>\*</sup>، زهرا حسن‌زاده<sup>۲</sup>

### چکیده

مقدمه: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات اندوکراین و مهم‌ترین دلیل عدم تخمک‌گذاری است. میزان بالای سایتوکین‌های التهابی سبب پیشرفت سندرم تخمدان پلی کیستیک می‌شود. گلیسیریزیک اسید از مهم‌ترین ساپونین‌های گیاه شیرین بیان است. با توجه به خواص کاهش دهنده تولید آندروژن و آنتی‌اکسیدانی شیرین بیان، هدف از این مطالعه تعیین اثر گلیسیریزیک اسید بر گنادوتروپین، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به ۴ گروه مساوی شاهد (تزریق محلول سالین در ۲۴ روز به صورت داخل صفاقی)، شاهد PCOS (تزریق محلول سالین در ۲۴ روز به صورت داخل صفاقی) و دو گروه PCOS تحت تیمار با گلیسیریزیک اسید (تزریق ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۲۴ روز به صورت داخل صفاقی) تقسیم شدند. سندرم تخمدان پلی کیستیک با یک‌بار تزریق عضلانی استرادیول والرات (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) القاء شد. در پایان دوره درمان، سطح سرمی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ، LH، FSH، استرادیول و تستوسترون توسط روش الایزا سنجش شد. داده‌ها توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تحلیل شد.

نتایج: در مقایسه با گروه شاهد PCOS، سطح سرمی LH، استرادیول، تستوسترون،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید، به صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p=0/001$ ). همچنین، سطح سرمی FSH به صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p=0/002$ ). نتیجه‌گیری: گلیسیریزیک اسید با کاهش سطح سرمی سایتوکین‌های التهابی اثر مطلوبی بر بهبود پارامترهای هورمونی در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک دارد.

واژه‌های کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، گلیسیریزیک اسید، سایتوکین‌ها، هورمون‌های استروئیدی گناد، موش‌های صحرایی

۱- دکتری تخصصی بیولوژی سلولی تکوین، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد

۲- دکتری تخصصی بیولوژی سلولی تکوین، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۵۳۰۲۶۳۱۳، پست الکترونیکی: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶

## مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک ( Polycystic Ovarian Syndrome) یک اختلال شایع غدد درون‌ریز است و با ازدیاد آندروژن‌ها و اختلال مزمن در تخمک‌گذاری همراه است. همچنین این عارضه با اختلال در قاعدگی و یا قطع قاعدگی، افزایش موهای زائد با الگوی مردانه (۱)، افزایش انسولین خون به دلیل مقاومت انسولینی، هیرسوتیسم، افزایش فشارخون، دیس لیپیدی، آترواسکلروز و سایر بیماری‌های عروقی همراه است (۲). در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک سطح سرمی هورمون لوتینه کننده (Luteinizing Hormone: LH) افزایش و سطح سرمی هورمون محرک فولیکولی (Follicle Stimulating Hormone: FSH) کاهش می‌یابد. افزایش در هورمون لوتینه کننده سلول‌های تکا تخمدان را تحریک کرده و سبب افزایش سنتز و ترشح آندروژن‌ها می‌شود (۳). همچنین از دیگر عوامل مؤثر در ایجاد سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌توان به اختلال در عملکرد محور هیپوفیز- تخمدان اشاره کرد (۴). مشخص شده است در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک فولیکول‌های تخمدانی تا مرحله آنترال پیش می‌روند و پس از آن روند تکوین فولیکول‌ها متوقف می‌شود. در ادامه، فرایند آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا شروع شده و با آتروزی فولیکول‌ها، فولیکول‌های کیستیک و آترتیک تشکیل می‌شود (۵).

طبق مطالعات انجام شده افزایش میزان سایتوکین‌ها مانند فاکتور تومور نکروزیس آلفا (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ )، اینترلوکین-۱بتا (Interleukin-1 $\beta$ : IL-1 $\beta$ ) و اینترلوکین-۶ (Interleukin-6: IL-6) نشان دهنده التهاب سیستمیک و موضعی بدن می‌باشد. همچنین شواهدی مبنی بر رابطه مستقیم و نزدیک بین التهاب سیستمیک و موضعی با تخمدان پلی‌کیستیک وجود دارد (۶). فاکتور تومور نکروزیس آلفا در تنظیم فعالیت طبیعی تخمدان در مرحله رشد فولیکولی نقش بسزایی دارد. ولی افزایش این فاکتور با القاء آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا فولیکول‌های تخمدان سبب ایجاد فولیکول‌های کیستیک می‌شود (۷). اینترلوکین‌ها، گروهی از سایتوکین‌ها هستند که

در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و واکنش‌های التهابی نقش دارند (۸). مشخص شده است سطح اینترلوکین‌ها به‌ویژه اینترلوکین ۱ آلفا (Interleukin-1 $\alpha$ ) و اینترلوکین-۱بتا در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد (۴).

امروزه اقدامات دارویی جهت درمان عدم تخمک‌گذاری در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک، استفاده از داروهای متنوعی نظیر متفورمین، کلومیفن و لتروزول است که متأسفانه هر کدام مکانیسم اثر متفاوت و عوارض جانبی زیادی را به دنبال دارند (۹،۱۰). از این رو یافتن ترکیباتی که این عوارض را کاهش دهند نقش ارزشمندی دارد. گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی از گذشته به‌عنوان مکملی مناسب جهت کاهش عوارض داروهای شیمیایی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن مطرح شده‌اند و مصرف آن‌ها رو به افزایش است. شیرین بیان با نام انگلیسی Licorice و نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) است (۱۱). ریشه و ریزوم شیرین بیان دارای ترکیبات متعددی نظیر قندها، فلاونوئیدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، صمغ، نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها می‌باشد. عمده‌ترین ساپونین آن گلیسیریزیک اسید به فرمول  $C_{42}H_{62}O_{16}$  است که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرترنیک تشکیل شده است (۱۲). بر اساس مطالعات انجام شده شیرین بیان بر سیستم غدد درون‌ریز بدن نیز تأثیرگذار است و مصرف آن ممکن است سطح سرمی تستوسترون خون را کاهش دهد (۱۳). همچنین به‌عنوان داروی مسکن در التهاب‌های پوستی و برای درمان اسپاسم، تورم و روماتیسم کاربرد دارد (۱۴). عصاره شیرین بیان در تنظیم متابولیسم استروئیدها مؤثر است و گلیسیریزیک اسید موجود در آن با جلوگیری از فعالیت ۱۱-بتا هیدروکسیژناز می‌تواند سبب کاهش تجمع چربی شود (۱۵). مشخص شده است شیرین بیان یک آنتی‌اکسیدان قوی است و مشتقات آن از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کرده و میتوکندری را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. همچنین گزارش شده است ترکیبات موجود در عصاره شیرین بیان با از بین بردن

رادیکال‌های آزاد خاصیت محافظتی و آنتی‌اکسیدانی دارد (۱۶). همچنین گزارش شده است عصاره شیرین بیان اثر حفاظتی در برابر آسیب کبدی ناشی از تیواستامید دارد که به‌واسطه اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنلی است (۱۷) و نیز کلیه‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو و نفروتوکسیسیته‌ی القاء شده توسط تجمع رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند و موجب افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کلیه می‌شود (۱۸).

با توجه به کاربردهای متنوع گیاه شیرین بیان و ترکیبات مؤثر آن در طب سنتی، هدف محقق از انجام این پژوهش تعیین اثر گلیسیریزیک اسید بر گنادوتروپین‌ها، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌باشد.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تعداد ۳۲ سر موش صحرایی با محدوده وزنی  $164 \pm 6$  گرم و سن تقریبی  $80 \pm 5$  روز از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد تهیه شد. حیوانات در دمای محیطی  $24 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی  $35 \pm 4$  درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند (۱۹). حیوانات در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) قرار داشتند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتر در اختیار آن‌ها قرار داده شد. همچنین از غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه نمودند. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۸ سر موش صحرایی) تقسیم شدند.

گروه ۱: موش‌های صحرایی گروه شاهد به مدت ۲۴ روز و به صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند.

گروه ۲: موش‌های صحرایی گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک به مدت ۲۴ روز و به صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند.

گروه ۳: موش‌های صحرایی گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار به مدت ۲۴ روز و به‌صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید (Sigma-Aldrich, Germany) با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

گروه ۴: موش‌های صحرایی گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار به مدت ۲۴ روز و به‌صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسیریزیک اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

برای اجرای این تحقیق، در ابتدا موش‌هایی انتخاب شدند که دارای ۲ الی ۳ دوره استروس منظم در طی ۱۲ الی ۱۴ روز مشاهده اسمیر واژینال، بودند. جهت تعیین منظم بودن سیکل استروس از اسمیر واژینال استفاده شد. ابتدا ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر مدل Transferpette®S (Brand, Germany) به آرامی در واژن حیوان تزریق شد. سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مدل CX21FS1 (Olympus, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر بررسی شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولید مثلی قرار داشتند جهت مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در مرحله استروس دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی‌لیال بوده و فاقد لوکوسیت است (۱۹). لازم به ذکر است در این روش از بین ۹۵ سر موش صحرایی ماده، ۳۲ سر انتخاب شد.

تخمدان پلی‌کیستیک توسط یک‌بار تزریق داخل عضلانی استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان، ایران) به میزان ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم القاء شد. مدت زمان لازم جهت ایجاد مدل تخمدان پلی‌کیستیک حدود ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات بود. جهت اطمینان از ایجاد تخمدان پلی‌کیستیک اسمیر واژینال تهیه شد. وجود سلول‌های شاخی به میزان زیاد در اسمیر واژینال از علائم وجود کیست‌های فولیکولی تخمدان است (۲۰). همچنین از هر گروه یک حیوان به صورت تصادفی انتخاب و پس از قربانی شدن با دوز کشنده دی‌اتیل اتر (Merck, Germany)، تخمدان‌ها خارج شدند. به‌دنبال طی مراحل پردازش بافتی و رنگ‌آمیزی تخمدان،

کمی است، توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد ( $p > 0/05$ ). جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین نتایج به دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت خطای معیار  $\pm$  میانگین (Mean  $\pm$  SEM) گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها  $0/05$  در نظر گرفته شد.

در این مطالعه کلیه موارد اخلاقی در پژوهش رعایت شده است و تمامی اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها تحت بیهوشی کامل انجام گرفته است. همچنین سعی شده است از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود. لازم به ذکر است تمام مراحل این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی نیشابور با کد IR.NUMS.REC.1395.47 مورد تصویب قرار گرفته است.

#### نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح سرمی هورمون FSH به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p = 0/001$ ).

تجویز داخل صفاقی گلیسیریزیک اسید با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، به صورت وابسته به دوز تزریقی موجب کاهش معنی‌دار سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون و نیز افزایش معنی‌دار سطح سرمی هورمون FSH شد ( $p = 0/004$ ). پس از مقایسه زوج بین دو گروه تحت تیمار با گلیسیریزیک اسید مشخص شد غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید در مقایسه با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید اثر بیشتر و معنی‌داری در بهبود سطح هورمونی موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک دارد ( $p = 0/006$ ). به عبارت دیگر مشخص شد اثرات گلیسیریزیک اسید وابسته به میزان دوز تزریقی است (جدول ۱).

کیست‌های تخمدانی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر مشاهده و القاء تخمدان پلی‌کیستیک در گروه‌های شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک و مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار مورد تأیید قرار گرفت.

در پایان دوره درمان دارویی، موش‌های صحرایی توسط دی‌اتیل اتر بی‌هوش شدند. سپس پوست ناحیه قفسه سینه، جناغ و دنده‌ها برش داده شد و با کنار کشیدن جناغ و دنده‌ها از بطن چپ قلب توسط سرنگ ۲ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد. خون گرفته شده بدون ماده ضد انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱۲ دقیقه در انکوباتور مدل INB400 (Memmert, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از وقوع انعقاد، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ مدل EBA280 (Hettich, Germany) به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس سرم خون روی بخش لخته شده توسط سمپلر جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۹). سطح سرمی پارامترهای خونی توسط روش ELISA، دستگاه الیزایدرد مدل 2100 (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت فاین‌تست (Finetest, China) سنجش شد. کیت LH با حساسیت  $0/938$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده  $100-1/563$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، FSH با حساسیت  $1/406$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده  $150-2/344$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، استرادیول با حساسیت  $0/422$  نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده  $45-0/703$  نانوگرم بر میلی‌لیتر، تستوسترون با حساسیت  $0/188$  نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده  $5000-20-0/313$  نانوگرم بر میلی‌لیتر، فاکتور تومور نکروزیس آلفا با حساسیت  $46/875$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده  $5000-78/125$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر، اینترلوکین-۱بتا با حساسیت  $18/75$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده  $2000-31/25$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر، اینترلوکین-۶ با حساسیت  $37/5$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده  $4000-62/5$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر.

اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۰ تحلیل شد. با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده

جدول ۱: مقایسه میانگین سطح سرمی هورمون‌های FSH, LH, استرادیول و تستوسترون به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

گروه / پارامتر	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	استرادیول (ng/ml)	تستوسترون (ng/ml)
شاهد	۳/۸۸±۰/۲۶	۹/۴۱±۰/۷۱	۳/۳۸±۰/۵۶	۳/۲۲±۰/۱۱
شاهد PCOS	<sup>a</sup> ۱۱/۱۷±۱/۰۵	<sup>a</sup> ۳/۵۴±۰/۱۹	<sup>a</sup> ۱۵/۶۴±۲/۳۲	<sup>a</sup> ۱۶/۰۳±۲/۸۱
PCOS تحت تیمار با ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید	<sup>b</sup> ۷/۳۱±۱/۹۵	<sup>b</sup> ۵/۲۷±۰/۷۲	<sup>b</sup> ۱۰/۲۰±۱/۹۲	<sup>b</sup> ۹/۱۴±۲/۰۸
PCOS تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید	<sup>bc</sup> ۵/۴۱±۱/۱۹	<sup>bc</sup> ۶/۵۷±۰/۴۶	<sup>bc</sup> ۶/۶۴±۱/۲۶	<sup>bc</sup> ۶/۲۰±۲/۵۵
سطح معنی‌داری (آنالیز واریانس یک‌طرفه)	۰/۰۰۵	۰/۰۱۹	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱

داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است؛ a : p=۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد، b: p=۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، c: p=۰/۰۰۶ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید

کیلوگرم گلیسیریزیک اسید وابسته به میزان دوز تزریقی به طور معنی‌داری کاهش یافت (p=۰/۰۰۵). سطح سرمی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱بتا و اینترلوکین-۶ در گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید به طور معنی‌داری کاهش یافت (p=۰/۰۰۷). (جدول ۲)

در پژوهش حاضر مشخص شد سطح سرمی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱بتا و اینترلوکین-۶ در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (p=۰/۰۰۱). در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، سطح سرمی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱بتا و اینترلوکین-۶ در گروه‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر

جدول ۲: مقایسه میانگین سطح سرمی سایتوکین‌های التهابی به تفکیک گروه

گروه / پارامتر	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
شاهد	۸۳/۵۷±۴/۳۳	۵۸/۲۷±۴/۷۴	۸۰/۲۵±۴/۳۲
شاهد PCOS	<sup>a</sup> ۱۷۲/۱۸±۳/۸۱	<sup>a</sup> ۱۱۴/۵۰±۶/۶۷	<sup>a</sup> ۱۶۱/۱۱±۵/۰۶
PCOS تحت تیمار با ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید	<sup>b</sup> ۱۲۹/۰۴±۵/۱۸	<sup>b</sup> ۸۷/۳۱±۴/۱۸	<sup>b</sup> ۱۳۸/۲۶±۴/۶۶
PCOS تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید	<sup>bc</sup> ۱۰۸/۴۴±۵/۸۰	<sup>bc</sup> ۶۵/۱۹±۴/۴۰	<sup>bc</sup> ۹۵/۴۶±۴/۳۷
سطح معنی‌داری (آنالیز واریانس یک‌طرفه)	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷

داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است؛ a : p=۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد، b: p=۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، c: p=۰/۰۰۸ در مقایسه با گروه مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید

## بحث

در این مطالعه اثر گلیسریریزیک اسید بر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IL-6 در موش صحرایی مدل سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های صحرایی حدود ۶۰ روز پس از یک‌بار تزریق داخل عضلانی استرادیول والرات به میزان ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم القاء شد. همچنین وجود علائم کیست‌های تخمدانی در موش صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک توسط اسمیر واژینال و بررسی بافت تخمدان مورد تأیید قرار گرفت. در پژوهشی مشابه به منظور القاء فنوتیپ سندرم تخمدان پلی‌کیستیک از روش القاء هورمونی توسط تزریق داخل عضلانی استرادیول والرات استفاده شد (۲۱). همچنین در پژوهشی دیگر مشخص شد حدود ۶۰ روز پس از تزریق زیر پوستی استرادیول والرات تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های صحرایی القاء می‌شود (۲۲).

در این پژوهش سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون در گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح سرمی هورمون FSH به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در پژوهشی مشخص شد سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در نتیجه ایجاد اختلالات اندوکرینی موجب افزایش سطح سرمی تستوسترون و بتا استرادیول می‌شود و این امر زمینه‌ساز بروز اختلال در تخمک‌گذاری و ناباروری است (۲۳). گزارش شده است در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تغییرات سرولوژیک به‌صورت کاهش FSH، پروژسترون و افزایش LH، استرادیول و تستوسترون می‌باشد (۲۴). پژوهشی روی تغییرات سطح سرمی هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک انجام شد و نتایج گویای افزایش معنی‌دار LH، استرادیول و تستوسترون در مقایسه با نمونه‌های سالم می‌باشد (۲۱). بر اساس نتایج پژوهش حاضر سطح سرمی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱بتا و اینترلوکین-۶ در موش‌های صحرایی شاهد

مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همسو با نتایج به دست آمده مطالعه‌ای به بررسی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین یک آلفا و اینترلوکین یک بتا در سرم خون بیماران مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک پرداخت و مشخص شد سطح سرمی اینترلوکین یک آلفا و بتا در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد ولی فاکتور تومور نکروزیس آلفا تغییر معنی‌داری نداشت. همچنین عنوان شده است پلی‌کیستیک شدن تخمدان‌ها می‌تواند یک بیماری التهابی مزمن خفیف باشد چرا که سایتوکین‌های التهابی به‌ویژه اینترلوکین‌ها به شدت در این بیماران افزایش می‌یابد (۲۵). مطالعه‌ای به بررسی میزان التهاب در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک پرداخت و مشخص شد سطح سرمی سایتوکین‌های التهابی، سطح سرمی پروتئین واکنشگر C و سرعت رسوب گلبول‌های قرمز به عنوان شاخص‌های تشخیصی التهاب، در خانم‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد (۲۶). تحقیقات نشان داده است در مبتلایان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک سطح سایتوکین‌ها و پروستاگلاندین‌ها که پیش برنده التهاب بافتی هستند، افزایش می‌یابد. از سوی دیگر مشخص شد پروستاگلاندین‌ها ترشح LH را از طریق تحریک ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین افزایش می‌دهد و در نهایت موجب ایجاد فولیکول‌های کیستیک می‌شود (۲۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد تجویز داخل صفاقی گلیسریریزیک اسید با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، به‌صورت وابسته به دوز تزریقی موجب کاهش معنی‌دار سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون و نیز افزایش معنی‌دار سطح سرمی هورمون FSH شد. تحقیقات نشان دهنده ترکیبات فلاونوئیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه شیرین بیان است (۲۸). طی تحقیقات انجام شده آنتی‌اکسیدان‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند منجر به

کاهش استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان شوند و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند تعداد فولیکول‌های کیستیک را در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک به طور معنی‌داری کاهش دهد (۲۹). در پژوهشی مشخص شده است القاء سندروم تخمدان پلی‌کیستیک توسط لئوروزول، سبب کاهش توان باروری در جنس ماده می‌شود و استفاده از عصاره هیدروآلکلی شیرین بیان به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند اثرات سوء هیپراندرژنیسم بر توان باروری موش ماده را بهبود بخشد (۳۰). گزارش شده است گلیسیریزیک اسید خاصیت آنتی‌آندروژنیک دارد و با القاء فیدبک منفی بر LH، میزان ترشح آندروژن‌ها را کاهش می‌دهد و به دنبال کاهش آندروژن‌ها، LH نیز به میزان کمتری تولید می‌شود و از تأثیر غالب LH بر FSH کاسته می‌شود که خود می‌تواند دلیلی بر راه‌اندازی مجدد مسیر طبیعی هورمون‌های چرخه جنسی و بروز تخمک‌گذاری در بیماران مبتلا سندروم تخمدان پلی‌کیستیک باشد (۳۱). همچنین همسو با نتایج پژوهش حاضر مشخص شده است عصاره شیرین بیان می‌تواند با مهار کردن ۱۷-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز سطح سرمی تستوسترون را در خانم‌ها کاهش دهد. و عنوان شد شیرین بیان می‌تواند در کاهش عوارض سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و هیرسوتیسم مؤثر باشد (۳۱).

در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، سطح سرمی سائتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱بتا و اینترلوکین-۶ در گروه‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید وابسته به میزان دوز تزریقی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در پژوهشی عنوان شد ترکیبات شیرین بیان با اثرات ضدالتهابی خود احتمالاً می‌تواند در تعدیل سطح سرمی هورمون‌های جنسی مؤثر باشد و باعث شروع مجدد تخمک‌گذاری در موش‌های صحرایی مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک شود (۳۲،۱۶). طی تحقیقات انجام شده شیرین بیان با دارا بودن خواص ضدالتهابی سبب مهار تولید پروستاگلاندین‌ها در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک می‌شود

(۳۳). در مطالعه‌ای سلول‌های سرطانی را تحت تأثیر گلیسیریزیک اسید قرار دادند و با سلول‌های طبیعی مورد مقایسه قرار دادند. نتایج حاکی از کاهش شدید بیان ژن‌های پیش‌التهابی بوده است (۳۴) با توجه به نتایج پژوهش حاضر و سایر تحقیقات می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً گلیسیریزیک اسید با کاهش التهاب توانسته است سبب تعدیل سطح هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک شود. لذا به‌منظور دستیابی به نتایج دقیق‌تر در راستای کاربردی شدن نتایج پژوهش حاضر، نیاز است مطالعاتی در زمینه تعیین اثر گلیسیریزیک اسید بر تغییرات فولیکول‌های تخمدان نمونه‌های آزمایشگاهی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک انجام شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان احتمال داد گلیسیریزیک اسید با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی توانسته است در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک سبب تغییرات معنی‌دار در سطح سرمی هورمون‌های محور هیپوفیز-تخمدان شود که این تغییرات در کنار کاهش شاخص التهاب نشان از بهبود نسبی علائم سیستمیک موش‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک دارد. همچنین با توجه به بازگشت تقریبی سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون به آستانه طبیعی در نمونه‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، می‌توان احتمال داد فرآیند تخمک‌گذاری و رشد طبیعی فولیکول‌ها از سرگرفته شود، که افزایش سطح سرمی FSH می‌تواند دلیلی بر این ادعا باشد. از این‌رو می‌توان گلیسیریزیک اسید را به‌عنوان فرآورده طبیعی در کاهش بخشی از علائم سندرم تخمدان پلی‌کیستیک معرفی کرد.

### سپاسگزاری

نویسنده مسئول مقاله بر خود لازم می‌داند از حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورد.

**References:**

- 1- Alchami A, O'Donovan O, Davies M. *PCOS: diagnosis and management of related infertility*. *Obstet Gynaecol Reprod Med* 2015; 25(10): 279-82.
- 2- Santbrink EJP, Fauser BCJM. *Ovulation induction in normogonadotropic anovulation (PCOS)*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20(2): 261-70.
- 3- Loffler S, Aust G, Kohler U, Spanel- Borowski K. *Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries*. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(12): 1143-49.
- 4- Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. *DHEA, DHEAS and PCOS*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 145: 213-25.
- 5- Petříkova J, Lazurova I. *Ovarian failure and polycystic ovary syndrome*. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7): 471-78.
- 6- Ciaraldi TP, Aroda V, Mudaliar SR, Henry RR. *Inflammatory cytokines and chemokines, skeletal muscle and polycystic ovary syndrome: Effects of pioglitazone and metformin treatment*. *Metabolism* 2013; 62(11): 1587-96.
- 7- Wang Y, Zhu W. *Evaluation of Adiponectin, Resistin, IL-6, TNF- $\alpha$  in Obese and Non-Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome*. *Reprod Contracept* 2012; 23(4): 237-44.
- 8- Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. *The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases*. *Cytokine* 2015; 76(1): 25-37.
- 9- Naderpoor N, Shorakae S, de Courten B, Misso ML, Moran LJ, Teede HJ. *Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update* 2015; 21(5): 560-74.
- 10- Goswami PK, Khale A, Ogale S. *Natural remedies for polycystic ovarian syndrome (PCOS). A review*. *Int J Pharm Phytopharm Res* 2012; 1(6): 396-402.
- 11- Khanahmadi MM, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S and et al. *A Review on Medicinal Plant of Glycyrrhiza glabra L*. *JMP* 2013; 2(46): 1-12.
- 12- Nassiri Asl M, Hosseinzadeh H. *Review of Antiviral Effects of Glycyrrhiza glabra L. and Its Active Component, Glycyrrhizin*. *JMP* 2007; 2(22): 1-12.
- 13- Colalto C. *Herbal in traction on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment*. *Pharmacol Res* 2010; 62(3): 207-27.
- 14- Xie Y, Dong X, Wu X, Yan X, Xie Q. *Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice*. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(2): 194-200.
- 15- Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E, Zanchin G, Armanini D. *A history of the therapeutic use of liquorice in*

- Europe. J Ethnopharmacol* 2005; 99(3): 317-24.
- 16- Fu Y, Chen J, Li Y, Zheng Y, Li P. *Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice*. *Food Chem* 2013; 141(2): 1063-71.
- 17- Asgary S, Madani H, Naderi G, Toori S, Taleb-Alhoseini M. *Hepatoprotective effect of Silybum marianum L. Gaertn and Glycyrrhiza glabra L. in the rats*. *JMP* 2005; 1(1): 18-24.
- 18- Aksoy N, Dogan Y, Iriadam M, Bitiren M, Uzer E, Ozgonul A, et al. *Protective and Therapeutic Effects of Licorice in Rats with Acute Tubular Necrosis*. *J Ren Nutr* 2012; 22(3): 336-43.
- 19- Sadoughi SD. *Investigation the Effect of Curcumin on the Hormones of Pituitary-Ovarian Axis in Alloxan-induced Diabetic Rats*. *J Ardabil Univ Med Sci* 2016; 16(4): 441-51.
- 20- Pahlevani P, Mosavi S, Rastgoo Haghi A, Lahotian H, Esna Ashari F, Alizadeh Z. *Study of the Effects of Stachys Lvandulifolia Alcoholic Extract on Histomorphometry of Endometrium in Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model*. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2016; 23(1): 40-8.
- 21- Alizadeh F, Azarnia M, Mirabolghasemi G, Karampoor P. *Effect of Fruit Heracleum persicum Extract on Changes in Serum Levels of Sex Hormones in Rats with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*. *Armaghane danesh* 2015; 20(1): 31-42.
- 22- Nabiuni M, Panahandeh SR, Doostikhah S, Karimzadeh Bardei L. *The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Raspberry Fruit on Ovarian follicles and serum parameters in Poly Cystic Ovary Syndrome-Induced Rat*. *Armaghane-danesh* 2015; 19(11): 955-68.
- 23- Rafiei S, Edalatmanesh MA. *The Effect of Exercise Training on Serum Level of  $\beta$ -Estradiol, Testosterone, and Cognitive Deficit in Rats with Letrozole-Induced Polycystic Ovary Syndrome*. *Shefaye Khatam* 2016; 4(2): 11-18.
- 24- Nabiuni M, Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh L. *The effect of curcumin on the estradiol valerate-induced polycystic ovary in rats*. *Feyz* 2015; 18(6): 515-23.
- 25- Zafari Zangeneh F, Abdollahi A, Naghizadeh MM, Bagheri M. *A low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome: Role of interleukin-1 alpha, 1 beta, 17A and TNF $\alpha$* . *Ijogi* 2015; 17(135): 9-15.
- 26- Yaghmaei M, Mokhtari M, Roudbari M, Harati M, Rashidi H, Dabiri S, et al. *Comparison of the CRP and ESR Levels between Women with Polycystic Ovarian Syndrome and Control Group*. *J Guilan Univ Med Sci* 2008; 17(65): 108-16.
- 27- Duleba AJ, Dokras A. *Is PCOS an inflammatory process?*. *Fertil Steril* 2012; 97(1): 7-12.
- 28- Mohammad Saleem MMN, Mohammad AAW, Al-Tameemi JA, Ghassan MS. *Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice*. *AJB* 2011; 10(59):12702-6.
- 29- Yilmaz N, Inal HA, Gorkem U, Sargin Oruc A, Yilmaz S, Turkhani A, et al. *Follicular fluid total*

- antioxidant capacity levels in PCOS*. J Obstet Gynaecol 2016; 36(5): 654-7.
- 30- Ahmadi A, Mostafavi M. *Effect of licorice root hydroalcoholic extract to improve the quality of fertility in hyperandrogenism- induced polycystic ovary syndrome by letrozole in mice*. J Shahrekord Univ Med Sci 2016; 17(6): 1-12.
- 31- Armaninia D, Mattarello MJ, Fiorea C, Bonannia G, Scaronia C, Sartorato P, et al. *Licorice reduces serum testosterone in healthy women*. Steroids 2004; 69(11-12): 763-6.
- 32- Armaninia D, Fiore C, Mattarello MJ, Bielenberg J, Palermo M. *History of The Endocrine Effects of Licorice*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2002; 110(6): 257-61.
- 33- Aly AM, Al-Alousi L, Salem HA. *Licorice: A possible anti-inflammatory and anti-ulcer drug*. AAPS PharmSciTech 2005; 6(1): 74-82.
- 34- Mehdinejadani K, Jalili A, Rafieian Kopaei M, Salimzadeh L, Mehdinejadani S, Mosavi M, et al. *Effect of Glycyrrhetic Acid and Glycyrrhizic Acid on the Expression of CXCR4 in Epithelial Cells of Gastric Carcinoma*. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(123): 149-58.

## Effect of Glycyrrhizic Acid on Gonadotropins, Estradiol, Testosterone and Inflammatory Cytokines in Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model

Seyed Damoon Sadoughi <sup>\*1</sup>, Zahra Hassanzadeh <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: 4 Feb 2017

Accepted: 6 Apr 2017

### Abstract

**Introduction:** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders and most important cause of anovulation. High levels of inflammatory cytokines cause deterioration of polycystic ovary syndrome. Glycyrrhizic acid is the most important saponins from licorice. Considering the hypoandrogenic and antioxidant properties of licorice, aim of this study was to determine the effect of glycyrrhizic acid on gonadotropins, estradiol, testosterone and inflammatory cytokines in polycystic ovarian syndrome rat model.

**Methods:** In this experimental study, 32 wistar female rats were divided into 4 equal groups of control (saline solution, 24 days, ip), PCOS control (saline solution, 24 days, ip) and two PCOS groups under treatment with glycyrrhizic (25 and 50 mg/kg, 24 days, ip). Polycystic ovarian syndrome was induced by single intramuscular injection of estradiol valerate (4 mg/kg). At the end of treatment period, serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, LH, FSH, estradiol and testosterone were measured using ELISA. Data were analyzed using one-way ANOVA and Post Hoc Tukey statistical tests ( $p < 0.05$ ).

**Results:** Compared to the PCOS control group, serum levels of LH, estradiol, testosterone, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in treated groups with 25 and 50 mg/kg glycyrrhizic acid dose-dependent significantly decreased. Also, serum level of FSH dose-dependent significantly increased ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Glycyrrhizic Acid by decreases serum levels of inflammatory cytokines has favorable effect on improving hormonal parameters in rats with polycystic ovary syndrome.

**Keywords:** Polycystic Ovarian Syndrome; Glycyrrhizic Acid; Cytokines; Gonadal Steroid Hormones; Rats

### This paper should be cited as:

Sadoughi SD, Hassanzadeh Z. Effect of Glycyrrhizic Acid on Gonadotropins, Estradiol, Testosterone and Inflammatory Cytokines in Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(1): 52-62.

\*Corresponding author: Tel: 09153026313, email: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir