

# اثر گلیسیریزیک اسید بر گنادوتروپین‌ها، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندروم تخدمان پلی‌کیستیک

سید دامون صدوqi<sup>\*</sup>، زهرا حسن‌زاده<sup>۱</sup>

## چکیده

**مقدمه:** سندروم تخدمان پلی‌کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین اختلالات اندوکرین و مهم‌ترین دلیل عدم تخم‌گذاری است. میزان بالای سایتوکین‌های التهابی سبب پیشرفت سندروم تخدمان پلی‌کیستیک می‌شود. گلیسیریزیک اسید از مهم‌ترین ساپونین‌های گیاه شیرین بیان است. با توجه به خواص کاهش دهنده تولید آندروژن و آنتی‌اسیدانی شیرین بیان، هدف از این مطالعه تعیین اثر گلیسیریزیک اسید بر گنادوتروپین، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندروم تخدمان پلی‌کیستیک 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. سندروم تخدمان پلی‌کیستیک با یکبار تزریق عضلانی استرادیول والرات (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) القاء شد. در پایان دوره درمان، سطح سرمی  $\alpha$ -TNF، IL-6، IL-1 $\beta$ ، FSH، LH، LTH، 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،  $\alpha$ -TNF- $\alpha$  و IL-6 در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیریزیک اسید، به صورت وابسته به دوز به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p=0.001$ ). همچنین، سطح سرمی FSH به صورت وابسته به دوز به طور 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 سندروم تخدمان پلی‌کیستیک دارد.

**واژه‌های کلیدی:** سندروم تخدمان پلی‌کیستیک، 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

در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و واکنش‌های التهابی نقش دارند (۸). مشخص شده است سطح اینترلوکین‌ها به ویژه اینترلوکین ۱ الف (Interleukin-1 $\alpha$ ) و اینترلوکین-۱ بتا در مبتلایان به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد (۴). امروزه اقدامات دارویی جهت درمان عدم تخمگذاری در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک، استفاده از داروهای متنوعی نظیر متغورمین، کلومیفن و لتروزول است که متأسفانه هر کدام مکانیسم اثر متفاوت و عوارض جانبی زیادی را به دنبال دارند (۹،۱۰). از این‌رو یافتن ترکیباتی که این عوارض را کاهش دهند نقش ارزشمندی دارد. گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی از گذشته به عنوان مکملی مناسب جهت کاهش عوارض داروهای شیمیایی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن مطرح شده‌اند و مصرف آن‌ها رو به افزایش است. شیرین بیان با Glycyrrhiza glabra L. و نام علمی Licorice 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 گلوكورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتینیک 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 به عنوان داروی مسكن 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-بتا‌هیدروکسیژناز 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

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) یک اختلال شایع غدد درون‌ریز است و با ازدیاد آندروجن‌ها و اختلال مزمن در تخمگذاری 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 لیپیدمی، آترواسکلروز و سایر بیماری‌های عروقی همراه است (۲). در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک سطح سرمی هورمون لوتنینه کننده (Luteinizing Hormone: LH) افزایش و سطح سرمی هورمون محرک فولیکولی (Follicle Stimulating Hormone: FSH) کاهش می‌یابد. افزایش در هورمون لوتنینه کننده سلول‌های تکا تخمدان را تحریک کرده و سبب افزایش سنتز و ترشح آندروجن‌ها می‌شود (۳). همچنین از دیگر عوامل مؤثر در ایجاد سندروم تخمدان پلی‌کیستیک می‌توان به اختلال در عملکرد محور هیپوفیز- تخمدان اشاره کرد (۴). مشخص شده است در مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک فولیکول‌های تخمدان را 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- $\alpha$ ، Interleukin-1 $\beta$ : IL-1 $\beta$ ، اینترلوکین-۶: 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

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

گروه ۴: موش‌های صحرایی گروه مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک تحت تیمار به مدت ۲۴ روز و به صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسیرینزیک 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 Transferette®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 اپی‌تلیال بوده و قادر لوكوسیت است (۱۹). لازم به ذکر است در این روش از بین ۹۵ سر موش صحرایی ماده، ۳۲ سر انتخاب شد.

تخدمان 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 تخدمان پلی‌کیستیک حدود ۶۰ روز پس از تزریق استرادیول والرات بود. جهت اطمینان از ایجاد تخدمان پلی‌کیستیک اسمیر واژینال تهیه شد. وجود سلول‌های شاخی به میزان زیاد در اسمیر واژینال از علائم وجود کیست‌های فولیکولی تخدمان است (۲۰). همچنین از هر گروه یک حیوان به صورت تصادفی انتخاب و پس از قربانی شدن با دوز کشنده دی‌اتیل اتر (Merck, Germany)، تخدمان‌ها خارج شدند. به‌دبیال طی مراحل پردازش بافتی و رنگ‌آمیزی تخدمان،

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 نفوتوکسیسیتی 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 گلیسیرینزیک اسید بر گنادوتروپین‌ها، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی در موش صحرایی مدل سندرم تخدمان 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  $۱۶۴\pm 6$  گرم و سن تقریبی  $۸۰\pm ۵$  روز از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد تهیه شد. حیوانات در دمای محیطی  $۲۴\pm ۳$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی  $۳۵\pm 4$  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 حلal دارو دریافت کردند.

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

کمی است، توسط آزمون کلوموگروف اسمرینوف 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 معنی داری 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 تخمنان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری افزایش و سطح سرمی هورمون FSH به طور معنی داری کاهش یافت ( $p < 0.001$ ).

تجویز داخل صفاقی گلیسیریزیک اسید با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخمنان پلی‌کیستیک در مقایسه با شاهد مبتلا به تخمنان پلی‌کیستیک، به صورت وابسته به دوز تزریقی موجب کاهش معنی دار سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون و نیز افزایش معنی دار 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 معنی داری در بهبود سطح هورمونی موش‌های صحرایی مبتلا به تخمنان پلی‌کیستیک دارد ( $p = 0.006$ ). به عبارت دیگر مشخص شد اثرات گلیسیریزیک اسید وابسته به میزان دوز تزریقی است (جدول ۱).

کیستهای تخمنانی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر مشاهده و القاء تخمنان پلی‌کیستیک در گروه‌های شاهد مبتلا به تخمنان پلی‌کیستیک و مبتلا به تخمنان 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 دندنهای برش داده شد و با کنار کشیدن جناغ و دندنهای از بطن چپ قلب توسط سرنگ ۲ میلی‌لیتر خون گیری انجام شد. خون گرفته شده بدون ماده ضد انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱۲ دقیقه در انکوباتور مدل Memmert, (INB400) 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 الایزایدیر مدل Stat Fax, USA 2100 و کیت‌های شرکت فاین‌تست (Finetest, China) سنجش شد. کیت LH با حساسیت  $< 0.938$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده ۱/۵۶۳-۱۰۰ میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، FSH با حساسیت  $< 1/406$  میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۵۰-۲۳۴۴ میلی واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر، استرادیول با حساسیت  $< 0.422$  نانوگرم بر میلی‌لیتر، تستوسترون با حساسیت  $< 0.188$  نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۰/۳۱۳-۰/۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، فاکتور تومور نکروزیس آلفا با حساسیت  $< 46/875$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۵۰۰۰-۵۷۸/۱۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، اینترلوکین-۱ بتا با حساسیت  $< 18/75$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۳۱/۲۵-۲۰۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، اینترلوکین-۶ با حساسیت  $< 37/5$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۶۲/۵-۴۰۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر.

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

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

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

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.

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

در پژوهش حاضر مشخص شد سطح سرمی سایتوکین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین-۱ بتا 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-۱ بتا و اینترلوکین-۶ در گروه‌های مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تیمار شده با ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر

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

IL-6 (pg/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	گروه / پارامتر
۸/۰/۲۵±۴/۳۲	۵۸/۲۷±۴/۷۴	۸۳/۵۷±۴/۳۳	شاهد
<sup>a</sup> ۱۶/۱/۱۱±۵/۰۶	<sup>a</sup> ۱۱۴/۵۰±۶/۶۷	<sup>a</sup> ۱۷۲/۱۸±۳/۸۱	شاهد PCOS
<sup>b</sup> ۱۳۸/۲۶±۴/۶۶	<sup>b</sup> ۸۷/۳۱±۴/۱۸	<sup>b</sup> ۱۲۹/۰/۴±۵/۱۸	PCOS تحت تیمار با ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیرینزیک اسید
<sup>bc</sup> ۹۵/۴۶±۴/۳۷	<sup>bc</sup> ۶۵/۱۹±۴/۴۰	<sup>bc</sup> ۱۰/۸/۴۴±۵/۸۰	PCOS تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیرینزیک اسید
۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	سطح معنی‌داری (آنالیز واریانس یک‌طرفه)

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 ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیسیرینزیک اسید

## بحث

مبلا به تخدمان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. همسو با نتایج به دست آمده مطالعه‌ای به بررسی سایتوکاین‌های فاکتور تومور نکروزیس آلفا، اینترلوکین یک آلفا و اینترلوکین یک بتا در سرم خون بیماران مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک پرداخت و مشخص شد سطح سرمی اینترلوکین یک آلفا و بتا در مبتلایان به تخدمان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد ولی فاکتور تومور نکروزیس آلفا تغییر معنی‌داری نداشت. همچنین عنوان شده است پلی‌کیستیک شدن تخدمان‌ها می‌تواند یک بیماری التهابی مزمن خفیف باشد چرا که سایتوکاین‌های التهابی به ویژه اینترلوکین‌ها به شدت در این بیماران افزایش می‌یابد (۲۵). مطالعه‌ای به بررسی میزان التهاب در مبتلایان به تخدمان پلی‌کیستیک پرداخت و مشخص شد سطح سرمی سایتوکاین‌های التهابی، سطح سرمی پروتئین واکنشگر C و سرعت رسوب گلbul‌های قرمز به عنوان شاخص‌های تشخیصی التهاب، در خانم‌های مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک افزایش می‌یابد (۲۶). تحقیقات نشان داده است در مبتلایان به سندروم تخدمان پلی‌کیستیک سطح سایتوکاین‌ها 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 گلیسیریزیک اسید با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک در مقایسه با شاهد مبتلا به تخدمان 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. 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

در این مطالعه اثر گلیسیریزیک اسید بر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استرادیول، تستوسترون و سایتوکین‌های التهابی TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  و IL-6 در موش صحرایی مدل سندروم تخدمان پلی‌کیستیک مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تخدمان 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 تخدمانی در موش صحرایی مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک توسط اسمیر واژینال و بررسی بافت تخدمان مورد تائید قرار گرفت. در پژوهشی مشابه به منظور القاء فنوتیپ سندروم تخدمان 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 تخدمان پلی‌کیستیک در موش‌های صحرایی القاء می‌شود (۲۲).

در این پژوهش سطح سرمی هورمون‌های LH، استرادیول و تستوسترون در گروه شاهد مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح سرمی هورمون FSH به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در پژوهشی مشخص شد سندروم تخدمان پلی‌کیستیک در نتیجه ایجاد اختلالات اندوکرینی موجب افزایش سطح سرمی تستوسترون و بتا استرادیول می‌شود و این امر زمینه‌ساز بروز اختلال در تخمک‌گذاری و نایاروری است (۲۳). گزارش شده است در موش‌های صحرایی مبتلا به تخدمان 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 سندروم تخدمان 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-۱ بتا و اینترلوکین-۶ در موش‌های صحرایی شاهد

(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 پیش التهابی 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 تخدمان 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 تخدمان نمونه‌های آزمایشگاهی مبتلا به تخدمان پلی‌کیستیک انجام شود.

### نتیجه‌گیری

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

کاهش استرس‌اسیداتیو در بافت تخدمان شوند و مصرف آنتی‌اسیدان‌ها می‌تواند تعداد فولیکول‌های کیستیک را در مبتلایان به تخدمان پلی‌کیستیک به طور معنی‌داری کاهش دهد (۲۹). در پژوهشی مشخص شده است القاء سندروم تخدمان پلی‌کیستیک توسط لتروزول، سبب کاهش توان باروری در جنس ماده می‌شود و استفاده از عصاره هیدرووالکلی شیرین بیان به عنوان یک آنتی‌اسیدان می‌تواند اثرات سوء هیپرآندروژنیسم 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 تخدمک‌گذاری در بیماران مبتلا سندروم تخدمان پلی‌کیستیک باشد (۳۱). همچنین همسو با نتایج پژوهش حاضر مشخص شده است عصاره شیرین بیان می‌تواند با مهار کردن ۱۷-هیدروکسی استروئید دهیدروژنانز سطح سرمی تستوسترون را در خانم‌ها کاهش دهد. و عنوان شد شیرین بیان می‌تواند در کاهش عوارض سندروم تخدمان پلی‌کیستیک و هیرسوتویسم مؤثر باشد (۳۱).

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

## 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- Loeffler 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- Petrikova 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- Colalito 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 valerateinduced 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 TNFa.* 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, Turkkani 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, Fiore 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- Mehdinejadiani K, Jalili A, Rafieian Kopaei M, Salimzadeh L, Mehdinejadiani S, Mosavi M, et al. *Effect of Glycrrhetic 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