

مصرف عصاره آبی شیرین بیان در قبل از تولد توانایی یادآوری را در موش های کوچک آزمایشگاهی بهبود می بخشد

محمد صوفی آبادی^{۱*}، محمد حسین اسماعیلی^۱، هاشم حق دوست یزدی^۱، حسن اژدری زرمهری^۱

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین
*آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی، تلفن: ۳۳۳۶۰۰۱ (۰۲۸۱)
پست الکترونیک: mohasofi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۱

تاریخ تصویب: ۸۹/۳/۲۲

چکیده

مقدمه: گیاه شیرین بیان حاوی آنتی اکسیدان و فیتواستروئول باخواص حفاظت کننده سلولی می باشد و مصرف آن در دوران بارداری ممکن است بر قابلیت های ذهنی تولد یافتگان تاثیر گذار باشد.

هدف: بنابراین اثر مصرف عصاره شیرین بیان در دوران حاملگی بر توانایی یادآوری نسل دوم موش های کوچک آزمایشگاهی بررسی شد. روش بررسی: از ۱۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده و ۶ نر از نژاد ان ماری با وزن ۲۰ - ۳۰ گرم استفاده و پس از آمیزش و مشاهده درپوش واژنی حاملگی مشخص شد، موش های حامله به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم و در قفس های جداگانه نگهداری شدند. گروه ها شامل: کنترل، گروه شم (گاواژ حلال) و گروه تیمار که عصاره آبی ریشه شیرین بیان (با دوز ۱۵۰ میلی گرم به طور خوراکی روزانه از روز ۳ تا ۱۹ بارداری) به آنها گاواژ می شد. ۲ ماه پس از زایمان، تولد یافتگان به گروه های ۱۰ تایی نر و ماده تقسیم و آزمون حافظه با استفاده از شاتل باکس انجام شد. تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون ANOVA و تست توکی توسط نرم افزار spss انجام شد.

نتایج: زمان تاخیر ورود به اتاقک تاریک در موش های نر تولد یافته در معرض عصاره، نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که در دوره زمانی ۱ و ۲ هفته پس از آموزش معنی دار بود ($p < 0/05$). همچنین زمان تاخیر ورود حیوانات تولد یافته ماده در معرض عصاره نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت که در دوره های زمانی ۲۴ ساعت و ۲ هفته پس از آموزش معنی دار بود ($p < 0/01$, $p < 0/05$). نتیجه گیری: مصرف عصاره شیرین بیان در دوران حاملگی می تواند میزان یادآوری حافظه را در نوزادان تولد یافته در هر دو جنس افزایش دهد.

گل واژگان: عصاره آبی، شیرین بیان، حاملگی، یادگیری، موش های کوچک آزمایشگاهی



مقدمه

شیرین بیان^۱ گیاهی است از خانواده پروانه واران که ریشه های این گیاه حاوی کومارین، فلاون، ایزولیکویریتگنین، گلابریدین، گلیسیریک اسید، روغن های فرار و استرول های گیاهی بوده و نیز گلی سیریزین به عنوان ماده ای فعال در ریشه آن یافت می شود. از شیرین بیان برای درمان انواع سرفه ها و اسپاسم و تورم برونش، روماتیسم و ورم مفاصل و به عنوان ملین استفاده می شود بسیاری از پزشکان فرآورده های تهیه شده از ریشه این گیاه را برای درمان زخم گوارشی و التهاب مزمن معده نیز تجویز می کنند [۱، ۲]. در دوران بارداری اختلالات گوارشی شایع اند و ممکن است این گیاه که برای درمان التهابات و زخم های گوارشی کاربرد دارد مصرف شود [۳].

مصرف داروها و ترکیبات مختلف در دوران حاملگی می تواند بسیاری از فرایندهای طبیعی فیزیولوژیک را در نوزادان تولد یافته تغییر دهد برای مثال مصرف مواد مخدر و به ویژه مرفین در دوران بارداری باعث اختلال در یادگیری فضایی موش های صحرایی پس از تولد نر و ماده در مدل های یادگیری و حافظه [۴] و ایجاد تغییر در پاسخ گیرنده های اوپیوئیدی و در نتیجه تغییر پاسخ به درد می شود [۵، ۶] و یا مصرف کوکائین در دوران بارداری باعث افزایش حساسیت و پاسخ گیرنده های اوپیوئیدی به مواد مخدر در متولدین می شود [۷].

گیاه شیرین بیان حاوی مقادیر زیادی فیتو استرول می باشد که ممکن است تاثیر مثبت یا منفی بر جنین داشته باشد. از طرفی تعداد قابل توجهی از گیاهان دارویی حاوی مقادیر متناهی از فیتو استروژن ها هستند. این مواد غیر استروئیدی اثر مدولاتوری برگیرنده استروژن دارند، لذا مصرف مواد مختلف می تواند آثار زیانبخش یا مفیدی بر سلامت جنین پس از تولد داشته باشد [۲].

فیتو استروژن ها استروژن های غیراستروئیدی مشتق از گیاهان هستند که در شیرین بیان به مقدار قابل توجهی یافت می شوند، اخیراً مطالعات فراوانی در مورد اثرات این مواد انجام و بعضی از فواید آنها شناسایی شده است برای مثال به عنوان استروژن طبیعی در درمان اختلالات ذهنی پس از یائسگی در

زنان مانند بیماری آلزایمر، اثر ضدالتهاب، آنتی اکسیدان، اثر حفاظتی بر نورون ها به ویژه نورون های کشت داده شده هیپوکمپ دارند [۳، ۸، ۹].

در یکی از مطالعات، در دو گروه از فیتو استروژن زنان یائسه به مدت ۳ ماه استفاده شد در پایان دوره درمان این گروه در مقایسه با گروه کنترل که دارویی دریافت نکرده بودند قدرت توجه بهبود زیادی داشت [۸].

در بررسی دیگر اثر استرادیول و سویا به مدت ۱۰ ماه در موش های ماده ثابت کرد که هر دو این مواد به طور وابسته به دوز کارایی حافظه را در مدل ماز شعاعی افزایش می دهند [۱۰].

هیپوکمپ از بخش های اصلی مرتبط با یادگیری و حافظه است که تحقیقات نشان داده مصرف استروئیدها در دوران بارداری بر آن به ویژه سلول های هرمی نواحی شاخ آمون تاثیرگذار است و در این زمینه اثر تستوسترون منفی خواهد بود [۱۱].

در مورد تاثیر این گیاه بر حافظه، پارل عصاره آبی شیرین بیان به طور خوراکی و به مدت ۷ روز به موش های سوری نر تجویز کرد که در دوز ۱۵۰ میلی گرم/کیلو بهترین اثر تقویت یادگیری را پیدا نمود [۱۲].

با توجه به وجود ترکیبات متعدد موثر بر سیستم عصبی در گیاه شیرین بیان و از آنجایی که در مورد تاثیر مصرف این گیاه در دوران جنینی بر حافظه و یادگیری پس از تولد اطلاع دقیقی در دست نیست و ممکن است مصرف این مواد در دوران بارداری اثر مفید و شاید هم منفی بر توانایی های ذهنی تولد یافتگان داشته باشد، لذا بنا به اهمیت موضوع و خلاء موجود، تحقیق حاضر به انجام رسید.

مواد و روش ها

نحوه تهیه عصاره آبی از گیاه بدین صورت بود که ابتدا ۶۰ گرم ریشه تازه گیاه تهیه و پس از تایید خشک و با آسیاب مخصوص پودر و با روش سوکسیله از آن حدود ۲۸ گرم عصاره آبی خالص استخراج شد. در این مطالعه تجربی ابتدا از ۱۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده و ۶ نر از نژاد NMARI (شرکت رازی ایران) با وزن حدود ۳۰ - ۲۰ گرم استفاده شد. پس از آمیزش و مشاهده درپوش واژنی حاملگی

¹ Glycyrrhiza glabra

نشان داده شده است. در این مطالعه ملاحظات اخلاقی مربوط به کار با حیوانات مصوب کمیته اخلاقی دانشگاه رعایت شد.

نتایج

یافته‌های به دست آمده نشان داد که بین دو گروه کنترل و شش تفاوت معنی‌داری در پاسخ‌ها وجود ندارد. دیگر اینکه، زمان تاخیر در ورود به اتاقک تاریک در موش‌های تولد یافته نر از مادرائی که مصرف خوراکی عصاره شیرین بیان را با دوز ۱۵۰ میلی گرم به طور روزانه در دوران حاملگی داشتند نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که در دوره زمانی ۱ و ۲ هفته پس از شوک معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱).

همچنین بین موش‌های تولد یافته ماده از مادران گروهی که مصرف خوراکی عصاره شیرین بیان را با دوز ۱۵۰ میلی گرم به طور روزانه در دوران حاملگی داشتند و گروه کنترل خود در زمان تاخیر ورود به اتاقک تاریک تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود داشت و زمان تاخیر در دوره‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۲ هفته پس از شوک افزایش معنی‌داری یافت (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

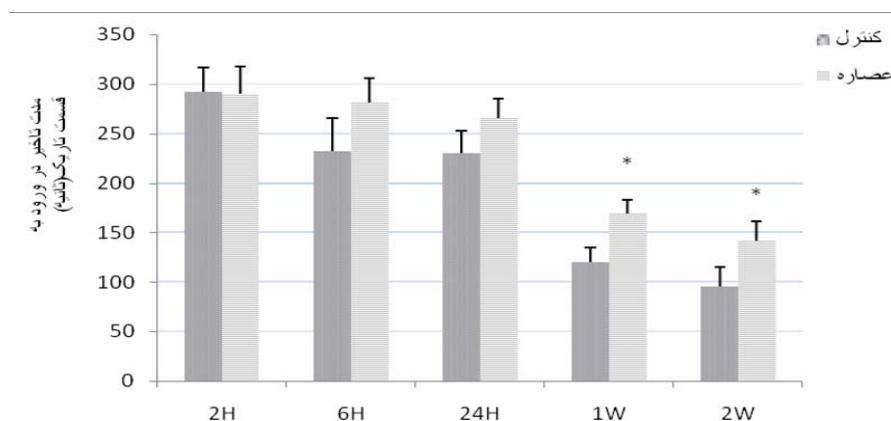
در موش‌های ماده افزایش یادگیری و حافظه هم در ۲۴ ساعت اول و هم در هفته دوم نسبت به گروه کنترل خود چشمگیر بود ولی در موش‌های نر ماندگاری حافظه فقط در هفته اول و دوم پس از آموزش اهمیت آماری داشت.

بحث

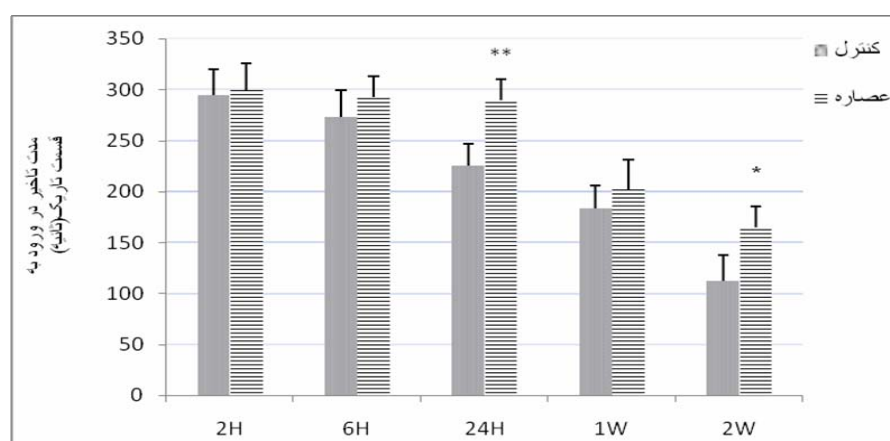
نتایج مطالعه ما نشان داد که مصرف عصاره شیرین بیان در دوران حاملگی بر توانایی یادآوری در نسل دوم موش‌های کوچک آزمایشگاهی موثر بوده و بر میزان حافظه نوزادان نر (بلند مدت) و ماده (کوتاه و بلند مدت) می‌افزاید. در مورد تاثیر این گیاه در دوران جنینی بر حافظه و یادگیری پس از تولد اطلاع دقیقی وجود ندارد. مصرف داروها و ترکیبات مختلف در دوران حاملگی می‌تواند بسیاری از فرایندها طبیعی فیزیولوژیک را در نوزادان تولد یافته تغییر دهد برای مثال مصرف مواد مخدر و به ویژه مرفین در دوران بارداری باعث اختلال در یادگیری فضایی موش‌های صحرایی پس از تولد نر و ماده در مدل‌های یادگیری و حافظه می‌شود [۴].

مشخص شد. موش‌های حامله به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم و در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند شامل: گروه کنترل که رژیم عادی در دوران حاملگی دریافت می‌کرد، گروه شش (رژیم عادی + گاوآز آب مقطر) و گروه تیمار که علاوه بر رژیم معمولی عصاره آبی ریشه شیرین بیان (با دوز ۱۵۰ میلی گرم به طور خوراکی روزانه) به مدت ۱۶ روز (از روز ۳ تا ۱۹) به آنها گاوآز می‌شد [۱۲]. پس از گذشت ۲ ماه از زمان تولد، از بین موش‌های تولد یافته، گروه‌های ۱۰ تایی نر و ماده به طور تصادفی انتخاب و آزمون یادآوری حافظه روی آنها انجام شد. برای این منظور از دستگاه شاتل باکس (مدل احترازی غیرفعال) به ابعاد $60 \times 18 \times 18$ سانتی متر استفاده شد که شامل دو اتاقک روشن و تاریک است که مابین آنها درب گیوتینی وجود دارد. کف اتاق‌ها از میله‌های فلزی که به فاصله ۱ میلی متر از هم قرار دارند، پوشیده شده است و از طریق یک استیمولاتور شوک الکتریکی به حیوان پس از ورود به اتاق تاریک اعمال می‌شود. برای انجام آزمون، حیوانات یک ساعت زودتر به آزمایشگاه منتقل تا به محیط عادت نمایند. سپس هر حیوان به آهستگی در اتاق روشن به مدت ۱۰ ثانیه گذاشته می‌شد، سپس درب را بالا برده و به محض ورود حیوان به اتاق تاریک درب گیوتینی پایین آورده شده و پس از ۵ ثانیه حیوان را از اتاقک خارج می‌کنیم. این آموزش نیم ساعت بعد هم تکرار می‌شد. در نیم ساعت سوم، با ورود حیوان به اتاق تاریک درب گیوتینی پایین آورده شده و شوک الکتریکی متناوب با شدت ۰/۵ میلی آمپری به مدت ۵ ثانیه و با فرکانس ۵۰ هرتز داده می‌شد و ۵ ثانیه بعد هم حیوان از اتاقک خارج می‌شد. این آزمون را مجدداً در ۲، ۶ و ۲۴ ساعت و ۱ و ۲ هفته بعد از شوک هم تکرار می‌شد با این تفاوت که پس از ورود حیوان به اتاق تاریک شوک نمی‌گرفت و زمان تاخیر ورود به اتاقک ثبت می‌شد. اگر دارویی اثر مثبتی بر حافظه داشته باشد دوره تاخیر را طولانی‌تر خواهد کرد و برعکس. داده‌های جمع‌آوری شده در گروه‌های مختلف توسط نرم افزار spss و با استفاده از آزمون یکطرفه ANOVA و به دنبال آن آزمون توکی مقایسه و تحلیل آماری شدند و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حد معنی‌دار تفاوت‌ها در نظر گرفته شد. نتایج این مطالعه به صورت میانگین خطای استاندارد در نمودارها





نمودار شماره ۱- مقایسه تاثیر مصرف روزانه عصاره شیرین بیان با دوز ۱۵۰ میلی گرم در دوران بارداری بر موش های نر تولد یافته با گروه کنترل در مدل اجتنابی غیرفعال



نمودار شماره ۲- مقایسه تاثیر مصرف روزانه عصاره شیرین بیان با دوز ۱۵۰ میلی گرم در دوران بارداری بر موش های ماده تولد یافته با گروه کنترل در مدل اجتنابی غیرفعال

است و به عنوان اندام هدف برای عملکرد استرادیول شناخته شده است. تراکم بالای گیرنده های استروژن و آندروژن در آن حکایت از رابطه میان استروژن ها و جنبه های ادراکی دستگاه عصبی است [۱۱].

بنابر آنچه ذکر شد محتمل است که فیتواستروژن های شیرین بیان بتوانند بر تعداد و یا عملکرد این گیرنده ها اثرگذار باشند. فیتواستروژن ها اثر ضدالتهابی و حفاظتی نیز دارند برای مثال، در یک بررسی تجربی به گروهی از موش ها که اوارکتومی شده بودند روزانه ترکیبات حاوی فیتواستروژن به مدت ۲ ماه داده شد و همزمان میزان فاکتورهای التهابی نیز سنجش شد. اوارکتومی موجب افزایش سایتوکین ها و تجویز فیتواستروژن موجب کاهش چشمگیر آنها و افزایش $TGF\alpha$

برخی از مطالعات مشابه اثر مفید مصرف این گونه مواد در دوران بارداری بر توانایی های ذهنی تولد یافته گزارش کرده اند، و یا در مطالعات دیگر اثر مهمی مشاهده نشده است. برای مثال در یک آزمایش تجویز پیش از تولد آندروژن و سپس در ادامه تجویز پس از تولد فیتواستروژن بر یادگیری موش های ماده تولد یافته تاثیری نداشت [۹]. در مطالعه ما مصرف عصاره آبی شیرین بیان موجب افزایش حافظه شد که مکانیسم آن باید با مطالعات تکمیلی شناخته شود. ولی بنا بر گزارش های موجود می توان احتمال داد که این امر متاثر از فیتواستروژن هایی باشد که در شیرین بیان به مقدار قابل توجهی یافت می شوند، این مواد اثر مثبتی بر نورون ها به ویژه نورون های هیپوکمپ دارند [۲، ۱۱، ۱۲]. هیپوکمپ از ساختارهای اساسی مرتبط با یادگیری

بنابر موارد یاد شده، احتمال آن است که عصاره شیرین بیان باعث حفاظت و تقویت ساختارها و نورون‌های مغزی مرتبط با حافظه و یادگیری در مقایسه با موش‌هایی که آن را دریافت نکرده‌اند، می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که مواد موثره عصاره می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف مانند اثر ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدآپتوزی از ساختارها و نورون‌های مغزی محافظت و در نهایت توانایی یادآوری را تقویت نمایند. برای اثبات دقیق فواید یا زیان‌های احتمالی مصرف این ماده در دوران حاملگی و نیز ارزیابی مکانیسم‌های مطرح شده، انجام مطالعات تکمیلی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت و همکاری کمیته تحقیقات علوم پایه دانشگاه علوم پزشکی قزوین در اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می‌شود.

شد و از تکثیر و فعالیت بی‌رویه سلول‌های گلیا که باعث آزادسازی مواد التهاب‌زا و نوروتوکسیک می‌شوند ممانعت کرد [۱۴]. ترکیبات فیتواستروژنی به راحتی می‌توانند از جفت عبور کرده و بر مغز جنین تاثیرگذارند [۱۵]. بنابراین ممکن است این ترکیبات از طریق بیان شده موجب حفاظت از نورون‌های مرتبط با یادگیری و حافظه مانند نورون‌های کلی نرژیک شده باشند. به علاوه نشان داده شده است که عصاره شیرین بیان از مغز موش‌ها هنگام هیپوکسی، از طریق کاهش رهائش گلوتامات، دوپامین و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و افزایش سطح عوامل آنتی‌اکسیدان محافظت می‌کند [۱۶، ۱۷]. همچنین گلابریدین که یکی از فلاونوئیدهای اصلی شیرین بیان است می‌تواند میزان آپتوز را هنگام سخته مغزی کم و اثر حفاظتی داشته باشد [۱۸]. همچنین گزارش شده که ایزولیکویریتگنین و گلیسیریک اسید نیز که از اجزای مهم شیرین بیان هستند اثر مواد توکسیک را بر برخی از سلول‌های عصبی کاهش می‌دهند [۱۹، ۲۰]. علاوه بر این که مواد فعال موجود در ریشه شیرین بیان ممکن است بتوانند بر سنتز پروتئین‌های مختلف و تمایز نورون‌ها موثر باشند، برای نمونه مشاهده شده که عصاره متانولی آن تمایز سلول‌های چربی را در محیط آزمایشگاه تحریک می‌کند [۲۱].

منابع

1. Akhondzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal Plants. Institute of Medicinal Plants jahade-Daneshgahi, arjmand publication. Iran. 1379, pp: 82.
2. Dijsselbloem N, Vanden Berghe W, De Naeyer A, Haegeman G. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68 (6): 1171 - 85.
3. Gharib Naseri MK, Arabian M, Gharib Naseri Z. Spasmolytic effect of Glycyrrhiza glabra Extract on rat ileum. Abstract Book of 18th Congress of Physiology & Pharmacology, mashhad - Iran, 2007; august 26 - 30, v: 11, 202.
4. Slamberova R, Schindler CJ, Pometlova M, Urkuti C, Purow-Sokol JA, Vathy I . Prenatal morphine exposure alters learning and memory in male rats. *Physiol Behav*. 2001; 73 (1-2): 93 - 103.
5. Chiou LC, Yeh GC, Fan SH, How CH, Chuang KC, Tao PL. Prenatal morphine exposure decreases analgesia but not K⁺ channel activation. *Neuroreport* 2003; 14 (2): 239 - 42.
6. Gagin R, Cohen E, Shavit Y. Prenatal exposure to morphine alters analgesic responses and preference for sweet solutions in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1996; 55 (4): 629 -



- 34.
7. Goodwin GA, Moody CA, Spear LP. Prenatal cocaine exposure increases the behavioral sensitivity of neonatal rat pups to ligands active at opiate receptors. *Neurotoxicol Teratol.* 1993; 15 (6): 425 - 31.
8. Woo J, Lau E, Ho SC, Cheng F, Chan C, Chan AS, Haines CJ. Comparison of Pueraria lobata with hormone replacement therapy in treating the adverse health consequences of menopause. *Menopause* 2003; 10 (4): 352.
9. Lund TD. Manipulation of prenatal hormones and dietary phytoestrogens during adulthood alter the sexually dimorphic expression of visual spatial memory. *BMC Neurosci.* 2001; 2 (1): 21.
10. Isgor C, Sengelaub DR. Prenatal gonadal steroids affect adult CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm Behav.* 1998; 34 (2): 183 - 98.
11. Harley CW, Malsbury CW, Squires A, Testosterone decrease CA1 plasticity invivo in gonadectomized male rats. *Hippocampus* 2000; 10: 131 - 8.
12. Parle M. Memory-strengthening activity of Glycyrrhiza glabra in exteroceptive and interoceptive behavioral models. *J. Med. Food* 2004; 7 (4): 462 - 6.
13. Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp. Biol. Med.* 2002; 227 (7): 509 - 19.
14. Doerge DR, Churchwell MI, Chang HC, Newbold RR, Delclos KB. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol.* 2001; 15 (2): 105 - 10.
15. Marotta F, Mao GS, Liu T, Chui DH, Lorenzetti A, Xiao Y, Marandola PA. Anti-inflammatory and neuroprotective effect of a phytoestrogen compound on rat microglia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1089: 276 - 81.
16. Muralidharan P, Balamurugan G, Venu B. Cerebroprotective effect of Glycyrrhiza glabra Linn. root extract on hypoxic rats, *J. Pharmacol.* 2009; 4: 60 - 4.
17. Hwang IK, Lim SS, Choi KH, Yoo KY, Shin HK. Neuroprotective effects of roasted licorice, not raw form, on neuronal injury in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Acta. Pharmacol. Sin.* 2006; 27 (8): 959 - 65.
18. Yu XQ, Xue CC, Zhou ZW, Li CG, Du YM, Liang J, Zhou SF. In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from Glycyrrhiza glabra (licorice). *Life Sci.* 2008; 82 (1 - 2): 68 - 78.
19. Jeon JP, Buono RJ, Han BG, Jang EY, Kim SC, Yang CH, Hwang M. Proteomic and Behavioral Analysis of Response to Isoliquiritigenin in Brains of Acute Cocaine Treated Rats. *J. Proteome Res.* 2008; 7 (12): 5094 - 102.
20. Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetinic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57 (2): 754 - 61.
21. Nakagawa K, Kishida H, Arai N, Nishiyama T, Mae T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A(y) mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27 (11): 1775 - 8.

