تاریخ چاپ زمستان ۱۳۹۲

اثر زهر زنبور عسل بر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال موش نژاد NMRI

محمد نبیونی*، مریم کاکایی، زهرا نظری، لطیفه کریم‌زاده؛
دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

کشت فولیکول‌های نابالغ تخمدان، ابزار مهمی برای بررسی تکوین فولیکولی است و به‌عنوان انتخابی در ناباروری استفاده می‌شود. زهرزنبورعسل (HBV[1]) متشکل از چندین ترکیب فعال بیولوژیکی است که اثرات آن در کمک به اوولاسیون فولیکول‌ها در رت اثبات شده است. هدف این پژوهش بررسی اثر HBV بر بلوغ انواع فولیکول‌های نابالغ در شرایط آزمایشگاهی و همچنین بررسی اثر آن بر کاهش بیان TNF-α به‌عنوان یک ژن پیش برنده تحلیل فولیکولی است. فولیکول‌ها از تخمدان موش جدا و در محیط α-MEM کشت داده شدند و بر اساس قطر فولیکولی به سه گروه پره آنترال کوچک، متوسط و بزرگ تقسیم گردیدند. هر سه گروه تحت تیمار 1µg/mlHBV قرار گرفتند. اثرات کشندگی HBV بر روی فولیکول‌ها به‌روش رنگ آمیزی تریپان بلو بررسی شد. قطر فولیکولی و تغییرات مورفولوژیکی نشان‌دهندهٔ بلوغ فولیکولی با اکولر مدرج و همچنین تغییرات بیان فاکتور TNF-α به‌روش فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج: بررسی قطر فولیکولی نشان داد کهHBV موجب افزایش (P<0.001) قطر فولیکول‌ها می‌شود. میزان تخمک‌های GV[2] درگروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ برآورد شد که این کاهش با P<۰/۰۰۱ معنی‌دار بود. درصد پیشرفت تخمک‌ها به مراحل میوز I در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب حدود۳۰٪ و ۴۳/۲٪ و به‌مرحلهٔ میوزII به‌ترتیب ۱۵٪ و ۲۲/۳٪ محاسبه شد. نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که HBV می‌تواند بیان TNF-α را در سلول‌های فولیکولی به‌میزان ۴٪ کاهش دهد. در مجموع می‌توان اظهار داشت که HBV سبب افزایش معنی‌داری در سیر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره انترال شده و در نتیجه موجب آمادگی بهتر برای لقاح می‌گردد. از طرفی نشان داده شد که HBV تا حدودی می‌تواند بیان فاکتور التهابی و نکروزه کننده TNF-α را کاهش دهد.

زمینه و هدف

کشت فولیکول‌های تخمدانی در شرایط آزمایشگاهی، موضوع مهمی در تکنولوژی تولید مثل کمکی است [۱]. این روش، برای ارزیابی فاکتورهای تنظیم کننده تکوین فولیکولی و در نهایت کمک به درمان ناباروری ناشی از

واژه‌های کلیدی: زهرزنبورعسل، فولیکولهای پره آنترال، بلوغ آزمایشگاهی، TNF-α
دریافت ۹۱/۷/۹ پذیرش ۹۲/۷/۳۰

***نویسنده مسئول** nabiuni@khu.ac.ir

۱. honney bee venom ۲. germinal vesicle

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، اختلال تخمدان نارس، نازایی متعاقب درمان سرطان و غیره استفاده می‌شود. به این ترتیب، بلوغ فولیکول‌ها به متافاز II و خروج اولین جسم قطبی آن‌ها نیز در شرایط *in-vitro* انجام گرفته است [۲]. تکوین فولیکولی طبیعی یک اووسیت که قادر به بارور شدن و تشکیل رویان باشد، وابسته به توالی پیچیده‌ای از برهمکنش‌های سلولی درون فولیکول است [۳]. در تنظیم بلوغ اووسیتی، در پستانداران، چندین فاکتور شامل سیتوکین‌های تخمدانی نقش دارند. زهر زنبورعسل (HBV) محتوی تنوعی از پپتیدها (ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده[۱])، آنزیم‌ها (فسفولیپاز A2) و آمین‌های فعال بیولوژیکی (هیستامین و اپی نفرین) است[۴]. یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که زهر زنبور در پیشرفت تکوین فولیکول‌های تخمدان در محیط *in-vivo*، مؤثر است [۵]، [٦]، [۷]. همچنین اثبات شده است که آنزیم‌ها و سیتوکین‌های موجود در HBV بر روی گنادوتروپین‌ها اثر تنظیمی دارند [۸]. گنادوتروپین‌های FSH و LH از طریق افزایش تولید آدنوزین ۳ و ۵ منوفسفات و متعاقباً فعال‌سازی MAPKDH یا پروتئین کیناز فعال کنندهٔ میتوژنی در سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت موجب شروع مجدد میوز اووسیتی می‌گردند [۹]. افزایش FSH در طول سیکل جنسی، با تحریک گیرندهٔ اختصاصی FSH در سلول‌های گرانولوزا سبب رشد فولیکول‌ها می‌شود. FSH، تکثیر سلول‌های گرانولوزا را در مرحلهٔ پره‌آنترال تشدید نموده و سنتز گیرنده‌های هورمون لوتئینیزه کننده (LH) را القا می‌کند [۱۰]. از طرفی TNF-α[۲] یکی از مارکرهای اترزی فولیکولی به‌شمار می‌رود [۱۱]. اعضاء فوق خانواده نکروزه کنندهٔ تومور، شناخته شده‌ترین مولکول‌های پیش آپوپتوزی مرتبط با مرگ سلول‌های گرانولوزا و آترزی فولیکولی هستند [۱۲]. تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر HBV بر پیش‌برندگی روند بلوغ فولیکولی و اثر آن بر کاهش بیان این ژن پیش‌برنده تحلیل فولیکولی صورت گرفت. هدف این تحقیق بررسی اثر مستقیم HBV بر روی تکثیر، رشد و نمو و بلوغ فولیکول‌های پره‌آنترال موش نژاد NMRI در محیط *in vitro*، اثر آن بر بیان TNF-α و همچنین بررسی اووسیت‌های اوله شده به‌منظور افزایش کیفیت لقاح در شرایط آزمایشگاهی است.

روش بررسی

کشت اولیه

این پژوهش از نوع پژوهش تجربی است. در این بررسی، از موش‌های نژاد NMRI استفاده شد. به‌منظور به‌دست آوردن فولیکول‌های تخمدانی موش‌های نابالغ ۱۶-۱۴روزه، به‌روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تخمدان‌های آن‌ها تحت شرایط استریل جراحی گردیده و خارج شدند. سپس فولیکول‌های پره‌آنترال (به تعداد ۱۵۰-۱۲۰ عدد در هر بار کشت)، با میکروسکوپ استریو به‌روش مکانیکی از تخمدان‌ها جدا گشته و به قطره‌های ۳۵µl حاوی محیط کشت αMEM (گیبکو، امارات)[۳] و مکمل‌هایی نظیر FBS۵٪ (گیبکو، امارات)، ITS۱٪ (گیبکو، امارات) وFSH۱۰۰IU/ml(مرک سرونو، سویس)[۴] منتقل شدند. قابل ذکر است هر کدام از قطره‌ها با ۳۵µl روغن معدنی (سیگما، آمریکا)[۵] پوشش داده شدند.

۱. mast cell ۲. Tumor Necrosis Factor- α ۳. Gibco-UK ۴. Merck Serono-Switzerland
۵. Sigma-USA

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

تعیین قطر فولیکولی مناسب برای کشت اولیه

به‌منظور انتخاب فولیکول‌های مناسب برای کشت ابتدا اندازهٔ اولیهٔ فولیکول‌های پره‌آنترال محاسبه شد. به این صورت که فولیکول‌های پره‌آنترال با عدسی چشمی مدرج زیر میکروسکوپ اندازه‌گیری شد و به سه گروه با سایزهای کوچک (۱۳۰-۸۰)، متوسط (۱۸۵-۱۳۱) و بزرگ (۲۳۵-۱۸۶) تقسیم شدند. سپس میزان بقا آن‌ها پس از گذشت ۴ روز از کشت اولیه با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شد. گروه فولیکولی با سایز متوسط (۱۸۵-۱۳۱) میزان بقا بیش‌تری را نشان داده و درنتیجه برای کشت اولیه استفاده شد.

تیمار فولیکول‌ها با HBV و بررسی بقا به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو

به‌منظور به‌دست آوردن دوز مناسب HBV (سیگما –آمریکا) با کشندگی کم برای تیمار، تعداد ۱۵۰-۱۲۰ فولیکول سایز متوسط (۱۸۵μm- ۱۳۱) که دارای بقا بیش‌تری هستند با غلظت‌های مختلف HBV (μgr/ml ۱،۲،۳،۴) تیمار شده و درصد بقا آن‌ها پس از گذشت چهار روز با رنگ‌آمیزی تریپان بلو محاسبه شد. پس از به‌دست آوردن دوز مناسب، فولیکول‌های جدیداً کشت داده شده به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شده و گروه تیمار دوز مناسب با کشندگی کم (۱μgr/ml) زهر زنبور دریافت نمودند.

بررسی تغییرات قطر فولیکولی، تکوین هسته ای و درصد تخمک‌های GV تحت تیمار با HBV

تغییرات قطر فولیکول‌ها تنها تا ۴ روز بعد از تیمار قابل بررسی است زیرا پس از این مدت سلول‌های گرانولوزا کف ظرف کشت پخش شده و امکان اندازه‌گیری قطر فولیکولی وجود ندارد. اندازهٔ قطر فولیکولی در گروه کنترل و همچنین گروه تیمار شده با HBV در روز صفر، اول، دوم و چهارم تیمار با اکولر مدرج زیر میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف (۱۰۰x، ۲۰۰x و ۴۰۰x) با محاسبهٔ دو قطر عمود بر هم بر حسب μm اندازه‌گیری شد. تخمک‌های GV یا حباب زاینده در روز چهارم کشت بررسی شد. در ادامه به‌منظور تحریک تخمک‌گذاری و تکمیل بلوغ فولیکول‌ها، مکمل‌های rEGF (سیگما-آمریکا) و hCG (مرک سرونو، سویس) در روز دهم کشت به محیط افزوده شده و ۴۸ ساعت بعد از نظر تکوین هسته‌ای بررسی شدند [۱۳]. اصطلاح بلوغ هسته‌ای شامل دوره‌ای بین شروع مجدد میوز اووسیتی که در مرحلهٔ پروفاز یک متوقف شده بود، و گذر به مرحلهٔ متافازII است. این رویداد از لحاظ مورفولوژیکی با شکست وزیکول زاینده و آزادسازی اولین گویچه قطبی (معیار تشخیص میوز I) مشخص می‌شود (۱۲).

بررسی بیان TNF-α به روش فلوسیتومتری

برای بررسی بیان TNF-α در سلول‌های گرانولوزای فولیکولی از روش فلوسیتومتری استفاده گردید. در این روش، ابتداسلول‌های گرانولوزا با تریپسین لیز شده و سپس به میکروتیوب‌های مناسب منتقل گردیده و ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ مجدد،

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

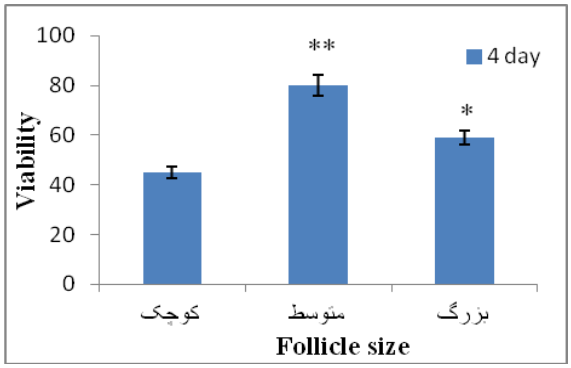
آنتی‌بادی اولیه TNF-α (Ab1793 Abcam) با غلظت 1:100 اضافه گردیده و تمام طول شب در یخچال قرار داده شدند. در روز بعد پس از شستشو و سانتریفیوژ آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC با غلظت ۱:۲۰ اضافه شده و ۴۵ دقیقه در یخچال نگه‌داری شد. سپس شست و شو و سانتریفیوژ مجدد انجام شده و در نعایت ۳۰۰ میکرولیتر فرمالین ۰/۱درصد به آن افزوده و توسط دستگاه فلوسیتومتر بررسی شد.

روش‌های آماری

داده‌های حاصل از بررسی بقا انواع فولیکول‌های تخمدانی با اندازه‌های مختلف و همچنین اثر HBV بر میزان بقا فولیکول‌های مختلف، قطر فولیکول‌ها، تعداد تخمک‌های GV با نرم‌افزار اینستات[۱] و تست پارامتریک آنوا[۲] آنالیز شده و نمودارها با نرم‌افزار اکسل[۳] رسم شدند. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و $P\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب شد.

نتایج

نتایج حاصل از تعیین قطر فولیکولی مناسب برای کشت اولیه: در تحقیق حاضر به‌منظور انتخاب فولیکوهای مناسب برای کشت اولیه ابتدا اندازهٔ اولیه فولیکول‌های پره‌آنترال محاسبه شده و سپس میزان بقا هر کدام از آن‌ها پس از گذشت ۴ روز با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی (نمودار ۱) نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال اندازهٔ متوسط (۱۳۱-۱۸۵µm) با $P<۰/۰۱$** میزان بقا بیش‌تری را نسبت به فولیکول‌های کوچک (۸۰- ۱۳۰µm) دارند، در حالی که فولیکول‌های بزرگ (۱۸۶-۲۳۵µm) با $P<۰/۰۵$* میزان بقائشان بیش‌تر از فولیکول‌های کوچک است. به همین سبب، برای کشت اولیه از فولیکول‌های با اندازهٔ متوسط (۱۳۱ -۱۸۵µm) استفاده شد.



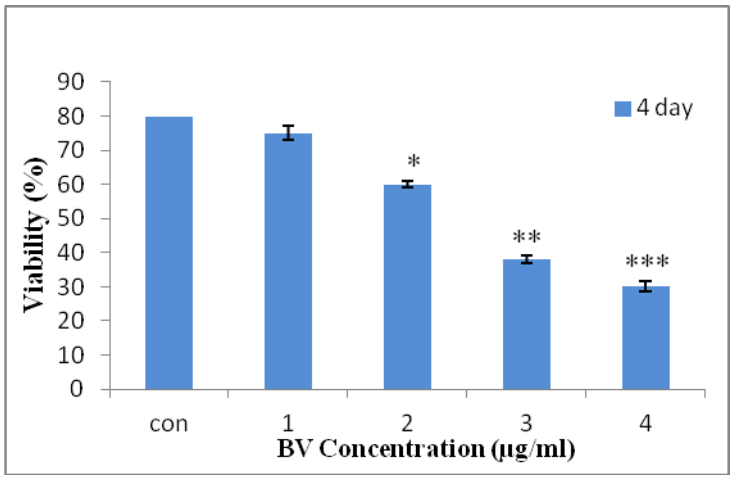
نمودار ۱. میزان بقا گروه‌های مختلف فولیکولی به‌روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو پس از گذشت ۴ روز در کشت اولیه

نتایج نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال سایز متوسط (۱۳۱ -۱۸۵µm) با $P<۰/۰۱$** میزان بقا بیش‌تری نسبت به فولیکول‌های کوچک دارند در حالی که فولیکول‌های بزرگ (۱۸۶-۲۳۵) با $P<۰/۰۵$* میزان بقائشان بیش‌تر از فولیکول‌های کوچک است میانگین± میزان خطا.

۱. INSTAT3 ۲. one-way ANOVA ۳. EXCEL

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

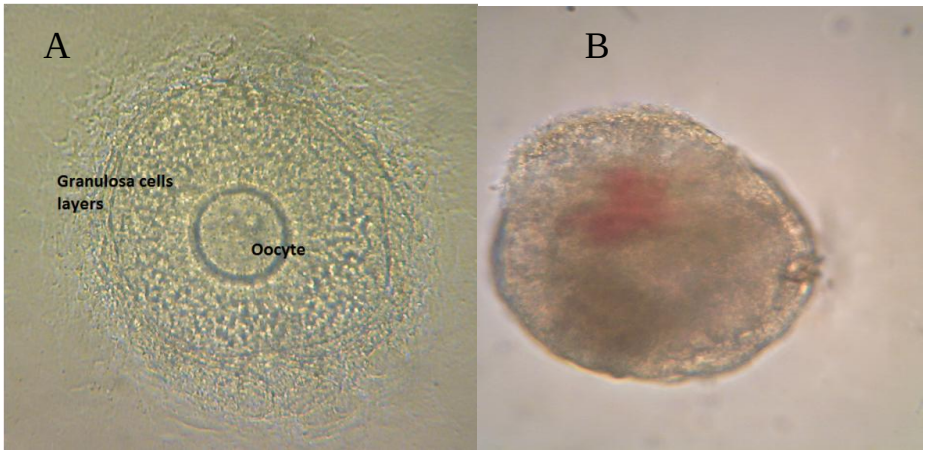
نتایج حاصل از بررسی بقا فولیکول‌ها تحت تحت تیمار با HBV: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف HBV (۱،۲،۳،۴µ gr/ml) بر بقا فولیکولی (نمودار ۲) نشان داد که دوز ۱µg/ml از HBV دارای کم‌ترین اثر کشندگی بر روی فولیکول‌هاست. در نتیجه این غلظت از HBV دوز مناسبی برای تیمار فولیکول‌ها تشخیص داده شد.



نمودار۲. مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف HBV بر درصد بقا فولیکول‌های پره‌آنترال پس از ٤ روزتیمار بر اساس رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو

نتایج نشان داد که غلظت ۱µg/ml از HBV بر روی فولیکول‌ها اثر کشندگی اندکی دارد. بنا بر این دوز مناسبی برای تیمار فولیکول‌ها به‌شمار می‌رود. $P<0/05^{*}$، $P<0/01^{**}$، $P<0/001^{***}$. تعداد فولیکول: ۱۵۰-۱۲۰ عدد. میانگین± میزان خطا.

فتومیکروگراف کشت اولیه فولیکول‌های پره‌آنترال در شکل ۱ نشان داده شده است.

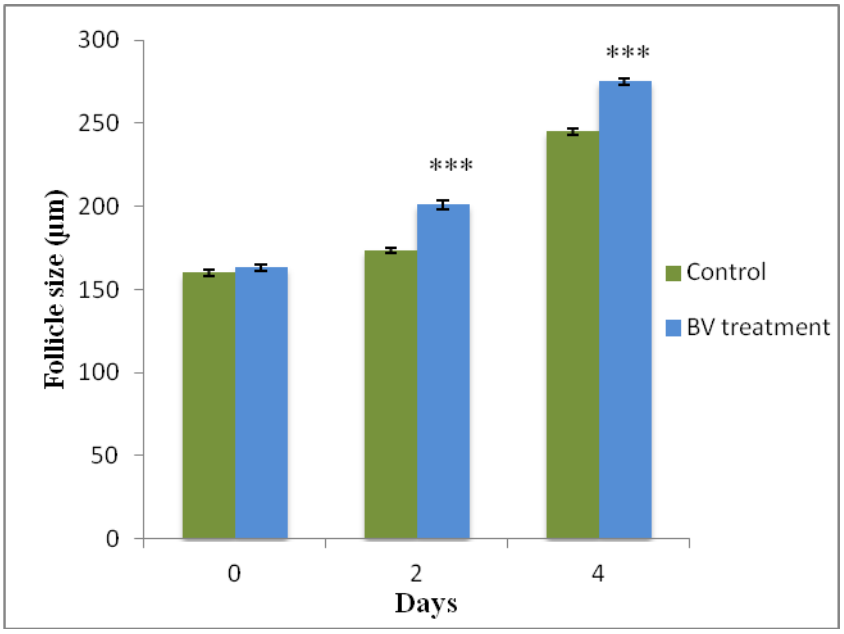


شکل۱. فتومیگروگراف میکروسکوپ معکوس مقایسه مورفولوژیکی فولیکول پره‌آنترال در طی کشت اولیه A) فولیکول پره‌آنترال طبیعی در روز صفر، B) فولیکول پره‌انترال در روز چهارم کشت. پراکندگی سلول‌های گرانولوزا از روز ۴ به بعد امکان اندزه گیری قطر فولیکولی را میسر نمی سازد. بزرگ‌نمایی (۲۰۰x)

نتایج حاصل از بررسی تغییرات قطر فولیکولی تحت تیمار با HBV: چنان‌که در شکل ۱ واضح است، به‌علت پخش شدن سلول‌های گرانولوزا بر کف ظرف، تغییرات قطر فولیکول‌ها تنها تا روز چهارم کشت قابل بررسی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

است. به همین سبب، بررسی تغییرات قطر فولیکولی تحت تیمار با HBV در روزهای بین صفر تا چهار انجام شد. قطر فولیکول‌ها در روز اول پس از تیمار تغییری را نسبت به روز صفر نشان نداد، بنا بر این برای مشاهده تغییرات، اندازه‌گیری به‌صورت یک روز در میان انجام شده که نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است. قطر متوسط فولیکول‌های تیمار شده با HBV در روز صفر کشت برابر ۱۶۳µm است که نسبت به گروه کنترل (۱۶۰µm) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. این در حالی است که قطر فولیکولی در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱µgr/ml زهر، در روز دوم کشت اولیه به‌ترتیب برابر ۱۷۳/۵۳±۲۸/۷۱µ m و ۲۰۱/۶۷±۳۳/۶۲µ m است که حاکی از اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بین این دو گروه است. در روز چهارم نیز میانگین قطر فولیکولی برای گروه کنترل و گروه تیمار به‌ترتیب ۲۴۵/۴۶±۲۶/۵۴µm و ۲۷۵/۵۶±۵۴/۷۸ µm محاسبه شد که این اختلاف با $p<۰/۰۰۱$ معنی‌دار است.



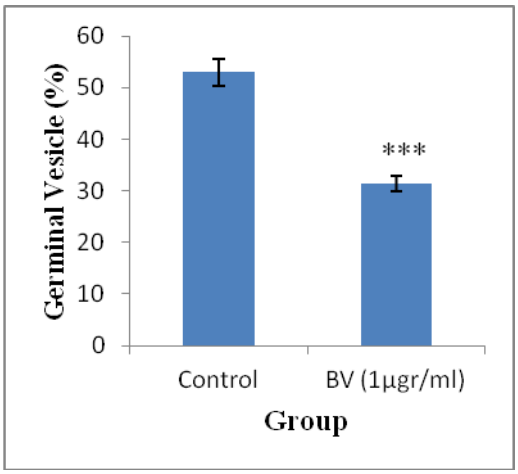
نمودار۳. نتایج حاصل از مقایسهٔ قطر فولیکولی در روزهای صفر، دوم و چهارم کشت اولیه. تفاوت قطر فولیکول‌های کنترل و تیمار شده در روز صفر کشت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در حالی که روز دوم و چهارم کشت این میزان با $P<۰/۰۰۱$ * معنی‌دار بود. تعداد تعداد فولیکول: ۱۵۰-۱۲۰ عدد. میانگین± میزان خطا .**

نتایج حاصل از بررسی درصد تخمک‌های GV در نمونه‌های کنترل و تیمار با HBV: در این تحقیق درصد تخمک‌هایGV در هر دو گروه کنترل و تیمار پس از چهار روز تیمار با HBV محاسبه شد. نتایج این بررسی میزان تخمک‌های GV را در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ نشان داد که بیانگر کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) آن در در گروه تیمارنسبت به گروه کنترل است (نمودار۴).

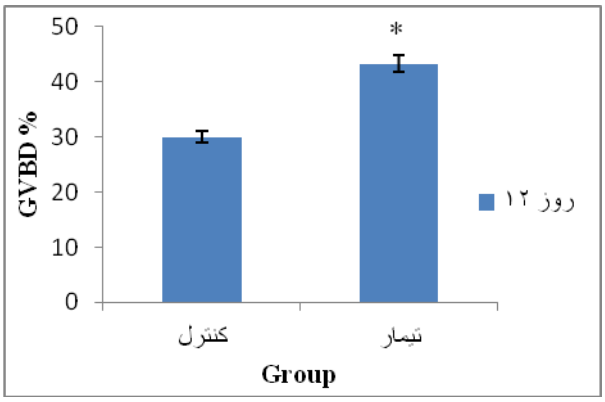
نتایج حاصل از تکوین هسته‌ای در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با HBV: از روز دهم کشت مکمل‌های rEGF وhCG به محیط کشت افزوده گردیده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. هستهٔ مرحله ژرمینال وزیکول نشانه عدم بلوغ هسته‌ای است. در مرحلهٔ بلوغ هسته‌ای و در نتیجه بلوغ تخمک

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

حباب زاینده دچار شکست می‌شود GVBD[1] که نشان‌دهنده پیشرفت تخمک‌ها به مراحل میوز I است. نتایج نشان داد که درصد فولیکول‌های دارای حباب زاینده شکسته شده در نمونه‌های تیمار شده با HBV نسبت به گروه کنترل بیش‌تر و به‌ترتیب حدود۳۰٪ و ۴۳/۲٪ است (نمودار۵).



نمودار۴. نتایج حاصل از درصد تخمک‌های GV در دو گروه کنترل و تیمار پس از گذشت چهار روز از کشت اولیه. نتایج این بررسی میزان تخمک‌های GV را در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ نشان داد که بیانگر کاهش معنی‌دار p<۰/۰۰۱ * آن در در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است. تعداد فولیکول: ۱۵۰-۱۲۰ عدد. میانگین± میزان خطا**

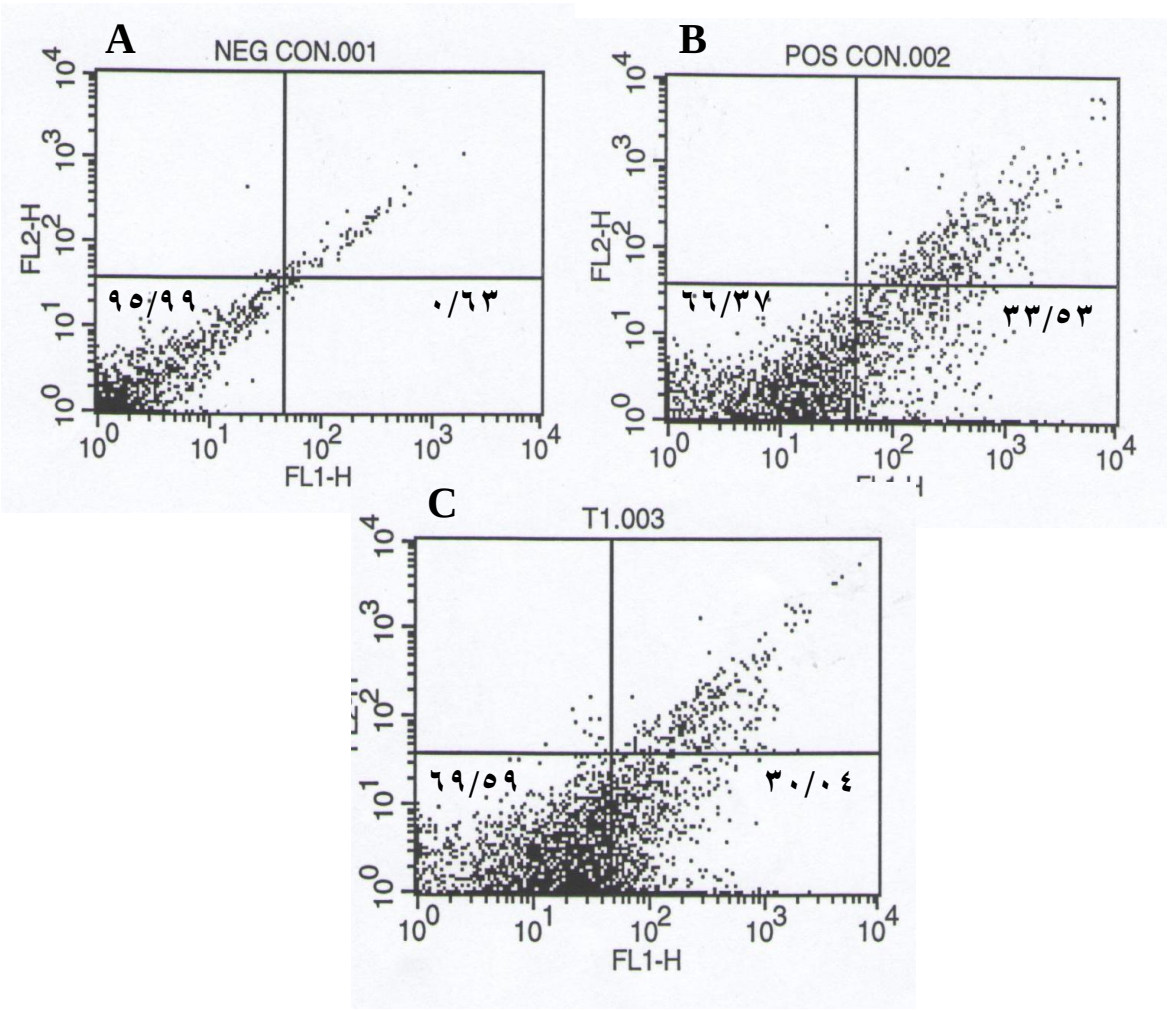


نمودار۵. نتایج حاصل از بررسی تکوین هسته‌ای در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با HBV در روز دوازدهم کشت. میزان شکست حباب زاینده در نمونه کنترل ۳۰٪ و در نمونهٔ تیمار شده با HBV حدود ۴۳/۲٪ برآورد شد که با P<۰/۰۵* معنی‌دار است. میانگین± میزان خطا

نتایج حاصل از بررسی بیان TNF-α به‌روش فلوسیتومتری: در روش فلوسیتومتری که برای بررسی بیان در سطح پروتئین به‌کار می‌رود، نتایج حاصل از بیان TNF-α در نمونهٔ کنترل مثبت ۳۳/۵۳درصد و در نمونه تیمار۳۰/۰۴ برآورد شد (شکل۲).

۱. germinal vesicle break down

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]



شکل۲. آنالیز فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر بیان TNF-α در مدت ۴ روز بعد از کشت در نمونه تیمار شده. محدوده تقسیم ۱/۴ بالا و پایین سمت راست میزان بیانTNF-α را نشان می دهد A:) نمونه کنترل منفی، B) نمونه کنترل مثبت، C) نمونه تیمار شده با HBV

بحث

بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌ها یک تکنیک کشت برای حمایت بلوغ اووسیت‌های نابالغ در شرایط آزمایشگاهی است که به‌عنوان درمان کمکی در ناباروری استفاده می‌شود. کاربرد این روش استفاده از داروهای تخمک‌گذاری قوی، زمان درمان، خطر سندرم تحریک بیش از حد تخمدان و سایر خطرهای مرتبط با تحریک هورمونی را کاهش می‌دهد [۱۴]. HBV شامل ترکیباتی نظیر: ملیتین[۱]، فسفولیپاز A2 (PLA2)، هیالورونیداز، آپامین، پپتید دگرانوله کننده ماست سل‌ها[۲]، پروکامین[۳]، سکاپین[۴]، ترتیاپین[۵] و ترکیبات دیگر نظیر هیستامین، دوپامین و نورادرنالین است [۱۵]. HBV نسبت به گنادوتروپین‌ها اثر بیش‌تری بر تکوین و بلوغ فولیکول‌های تخمدان در محیط *in-vivo* دارد [۱۶]. ملیتین و آپامین به‌دلیل داشتن خواص ضدالتهابی شبیه کورتیزول، می‌توانند

۱. melitin ۲. MCD peptide ۳. procamine ۴. secapin ۵. tertiapin

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

برای درمان ناباروری ناشی از انسداد لوله فالوپ، بهبود نتایج IVF، بهبود انتقالات عصبی به‌کار گرفته شوند [۱۷]، [۱۸]. در تحقیق حاضر ابتدا اثر HBV بر روی بقا فولیکولی بررسی شد. نتایج نشان داد که زهر زنبور در غلظت ۱mg/ml اثر کشندگی اندکی بر روی سلول‌ها دارد. در ادامه اثر این ترکیب بر روی رشد و بلوغ فولیکولی بررسی شد. نتایج نشان داد که HBV موجب افزایش معنی‌داری در بلوغ فولیکول‌ها در محیط آزمایشگاهی می‌شود. در سال ۲۰۰۳ علی و همکاران اثر HBV را بر تکوین فولیکولی در رت بالغ بررسی نمودند. یافته‌های این تحقیق نشان داد که بر اثر تیمار زهر زنبور تعداد فولیکول‌های بدوی و همچنین بالغ در تخمدان رت افزایش می‌یابد [۶]. در بررسی دیگری که همین محققان در سال ۲۰۰۰ انجام دادند اثر زهر زنبور عسل بر بهبود علائم سندروم تخمدان پلی‌کیستیک پنجاه بیمار بررسی شد. در بررسی آن‌ها بیمارانی که HBV را دریافت کردند کاهش معنی‌دار سطح هورمون لوتئینی، آندروستندیون و تستوسترون را نشان دادند. همچنین اوولاسیون در ۷۵٪ از آن‌ها القا شده و بارداری در ۵۰٪ بیماران روی داد [۷]. نتایج حاصل از بررسی حاضر نیز نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های گذشته را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که HBV در غلظت‌های کم و غیر سمی موجب افزایش چشمگیری در رشد بلوغ فولیکولی می‌گردد.

TNF-α سیتوکینی غیرگلیکوزیله است که مشخص شده است نقش مهمی را در عمل‌کرد تخمدانی ایفا می‌کند، طبق گزارشی، ترشح موضعی TNF-α می‌تواند سبب آپوپتوز جسم زرد و آترزی فولیکولی گردد. حضور TNF-α mRNA در انواع سلول‌های تخمدانی نظیر ماکروفاژها، اووسیت، سلول‌های لوتئال و گرانولوزا در گونه‌های مختلف گزارش شده است. TNF-α اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های غشای سلولی اعمال می‌کند [۱۹]. TNF-α اثرات ممانعتی بر روی استروئیدسازی و فولیکول‌سازی دارد که مرتبط با چندین پاسخ التهابی است [۲۰]. در پستانداران TNF-α در تخمدان بر روی تمایز، تکثیر، تولید استروئید، التهاب و القاء آپوپتوز از طریق گیرنده‌های اختصاصی‌اش عمل می‌کند و به‌عنوان واسطهٔ تخمک‌گذاری از طریق نقش تحریکی آن بر روی آپوپیتوز فولیکولی و شکست ماتریکس خارج سلولی در دیواره فولیکول است [۲۱] TNF-α یکی از مارکرهای اترزی فولیکولی است، بنا بر این این تحقیق برای اثبات اثر HBV بر پیش‌برندگی روند بلوغ فولیکولی و اثر آن بر کاهش بیان این ژن پیش‌برنده تحلیل فولیکولی صورت گرفت. نتایج بررسی حاضر نشان داد که زهر زنبور عسل تا حدودی می‌تواند بیان TNF-α را در سلول‌های گرانولوزا کاهش دهد. کی‌یانگ-وود کیم[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر سرکوب کنندگی زهر زنبور را بر پاسخ ایمنی به التهاب مفاصل را بررسی کردند و نتیجه این پژوهش نشان داد به‌کار گیری زهر زنبور عسل، تولید مفرط چندین سیتوکین نظیر :IFN-ϒ,IL-1β,TNF-α ناشی از آرتریت را کاهش می‌دهد [۲۲]. پارک[۲] و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثرات سرکوب کنندهٔ HBV را بر روی TNF-α در سلول‌های کبدی بررسی و اثبات کرد که HBV اثر مهار کنندگی TNF-α در سلول‌های کبدی دارد [۱۸]. نتایج تحقیق حاضر نیز نتایج به‌دست آمده پارک و همکاران را تأییدکرد و نشان داد که HBV در غلظت اندک ۱µgr/ml می‌تواند بیان TNF-α را کاهش دهد.

۱. Kyung-Woon Kim ۲. Park

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که که زهرزنبورعسل سبب افزایش معنی‌داری در سیر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره‌انترال شده و در نتیجه موجب آمادگی بهتر برای لقاح می‌گردد که این می‌تواند مربوط به اثرات ضدالتهابی آن باشد. همچنین نشان داده شد که HBV می‌تواند بیان TNF-α که پروتئینی مهارکننده بلوغ فولیکولی است را کاهش دهد. بنا بر این امید است بتوان با انجام تحقیقات بیش‌تر و با استفاده از طب مکمل زنبوردرمانی به درمان ناباروری کمک کرد.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق در قالب پروژۀ کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام گرفته است، لذا از رئیس محترم دانشکده علوم زیستی که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم کردند صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

1. N. Desai, A. Alex, F. AbdelHafez, A. Calabro, J. Goldfarb, A. Fleischman, et al, "Three dimensional *in-vitro* follicle growths: overview of culture models, bio materials, design parameters and future directions", Reproductive Biology and Endocrinology, 8 (2010).
2. S .A. Pangas, H. Saudye, L. D. Shea, T. Woodruff, "Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes", Tissue Engineering, 9 (2003) 1013-21.
3. J. Wu, B.R. Emery, D.T. Carrell, "*In-vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles" Biology of Reproduction, 64 (2001) 375-381.
4. H. Luo, X. Zuo, T. Li, J. Zhang, "Effect of bee venom on adjuvant induced arthritis in rats", Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 31 (2006) 948-951.
5. A. F. M. Ali, M. Mostafa, A. Gaafar, S. El-shayeb, Z. El-bashir, "Bee venom promotes *in-vivo* follicular development of immature rats. Fertility and Sterility", 80 (2003) 264-265.
6. A. F. M. Ali, M. Mostafa, A. S. Gaafar, El-shayeb, Z. El-bashir, "Comparetive study between bee venom and gonadotropine for follicular development of immature rats Fertility and Sterility", 80(2003) 264-265.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

7. A. F. M. Ali, B. Fateen, A. Ezzet, H. Badawy, A. Ramadan, A. El-tobge, "Laparoscopic intarovarian injection of bee venom in treatment of poly cystic ovarian disease: a new modality", Obstetrics & Gynecology, 95 (2000) 963-966.

8. L. Kiesel, T. Rabe, G. Hauser, A. Przylipiak, F. Jadali, B. Runnebaum, "Stimulation of luteinizing hormone release by melittin and phospholipase A2 in rat pituitary cells", Mol Cell Endocrinal, 51 (1987) 1-6.

9. M. Zhang, H. Ouyang, G. Xia, "The signal path way of gonadotrophins Induced mammalian-noocyte meioticresumption", Molecular Human Reproduction, 15 (2010) 399-409.

10. M. A. Sirard, S. Desrosier, M. Assidi, "*In-vivo* and *in-vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence", Theriogenology, 68 (2007) 71-76.

11. Diego Crespo1, Emilie Bonnet, Nerea Roher, Simon A MacKenzie, Aleksei Krasnov, Frederick W Goetz,Julien Bobe and Josep V Planas, "Cellular and molecular evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in the ovulatory mechanism of trout Reproductive Biology and Endocrinology" (2010) 8-34.

12. H Chen, L Jenifer, W Marcinkie, M Sancho, J. Hunt, P. F. Terranova, "Tumor Necrosis factor-a gene expression in mouse oocytes and follicular Cells", Biology of Reproduction 48 (1993) 707-714

13. W. Wang, Y. Tang, L. Ni, T. Jongwutiwes, H.C. Liu, Z. Rosenwaks, "A modified protocol for in vitro maturation of mouse oocytes from secondary preantral follicles", Fertility and Sterility 96 (2011) 57-74.

14. L. Vanhoutte. Strategies to improve in vitro maturation of human and mouse oocytes, "Ghent University", Faculty of Medicine and Health Sciences, 129 (2009) 1-129.

15. T. Shimizu, M. Kawahara, Y. Abe, M. Yokoo, H. Sasada, E. Sato, "Follicular Microvasculature and Antigenic Factors in the Ovaries of Domestic Animals", Reproduction and Development, 49 (2003) 181-192.

16. S. Helena, N. Deepak, M. Anurupa, "Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles", Molecular and Cellular Endocrinology, 272 (2007) 22–37.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]

17. C. Baravalle, N. Salvetti, G. Mira, N. Pezzone, H. Ortega, "Microscopic characterization of follicular structure in letrosole-induced poly cystic ovarian syndrome in the rat", Archives of Medical Research, 37 (2006) 830-839.
18. J. H. Park, K. H. Kim, S. J. Kim, W. R. Lee, K. G. Lee, S. M. Han, K. K Park, "Bee venom protects against TNF-α-induced hepatic cell damage via inhibition of pro-inflammatory cytokine production and NF-κB pathway", Korean Journal of Apiculture, 25 (2010) 173-180.
19. G. Madhusudan, R. Dev, M. Sharma, D. Singh, "Expression of mRNAs encoding tumor necrosis factor-α and its receptor-1 in buffalo ovary Indian Journal of Experimental Biology", 45 (2007) 669-675.
20. D. Son, K. Roby, P. Terranova, "Tumor necrosis factor-alpha induces serum amyloid A3 in mouse granulosa cells. Endocrinology", 145 (2004) 2245-52.
21. F. Gonzalez, N. Rote, J. Minium, J. Kirwan, "Increased activation of NF-κB triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome", J Clin Endocrinol Metab, 91 (2006) 1508-1512.
22. K. Kim, Y. Shin, K. Kim, Y. Chang, K. Park, J. Park, J. Choe, K. Lee, M. Kange, Y. Park, C. Kim, "Suppressive effects of bee venom on the immune responses in collagen-induced arthritis in rats", Phytomedicine. 15 (2008) 1099-1107.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-26]