

## 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. زهر زنبور عسل (HBV<sup>۱</sup>) 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- $\alpha$  به‌عنوان یک ژن پیش‌برنده تحلیل فولیکولی است. فولیکول‌ها از تخمدان موش جدا و در محیط MEM- $\alpha$  کشت داده شدند و بر اساس قطر فولیکولی به سه گروه پره آنترال کوچک، متوسط و بزرگ تقسیم گردیدند. هر سه گروه تحت تیمار 1  $\mu\text{g/ml}$  HBV قرار گرفتند. اثرات کشندگی HBV بر روی فولیکول‌ها به‌روش رنگ آمیزی تریپان بلو بررسی شد. قطر فولیکولی و تغییرات مورفولوژیکی نشان‌دهنده بلوغ فولیکولی با اکولر مدرج و همچنین تغییرات بیان فاکتور TNF- $\alpha$  به‌روش فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج: بررسی قطر فولیکولی نشان داد که HBV موجب افزایش ( $P < 0.001$ ) قطر فولیکول‌ها می‌شود. میزان تخمک‌های GV<sup>۲</sup> در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ برآورد شد که این کاهش با  $P < 0.001$  معنی‌دار بود. درصد پیشرفت تخمک‌ها به مراحل میوز I در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب حدود ۳۰٪ و ۴۳/۲٪ و به‌مرحله میوز II به‌ترتیب ۱۵٪ و ۲۲/۳٪ محاسبه شد. نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که HBV می‌تواند بیان TNF- $\alpha$  را در سلول‌های فولیکولی به‌میزان ۴٪ کاهش دهد. در مجموع می‌توان اظهار داشت که HBV سبب افزایش معنی‌داری در سیر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال شده و در نتیجه موجب آمادگی بهتر برای لقاح می‌گردد. از طرفی نشان داده شد که HBV تا حدودی می‌تواند بیان فاکتور التهابی و نکروزه‌کننده TNF- $\alpha$  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 تنظیم‌کننده تکوین فولیکولی و در نهایت کمک به درمان ناباروری ناشی از

واژه‌های کلیدی: زهر زنبور عسل، فولیکول‌های پره آنترال، بلوغ آزمایشگاهی، TNF- $\alpha$

پذیرش ۹۲/۷/۳۰

دریافت ۹۱/۷/۹

\*نویسنده مسنول nabiyuni@khu.ac.ir

۱. honey bee venom

۲. germinal vesicle

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 زنبور عسل (HBV) محتوی تنوعی از پپتیدها (ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله‌کننده<sup>۱</sup>)، 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]، [۶]، [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 آندوزین ۳ و ۵ منوفسفات و متعاقباً فعال‌سازی MAPKDH یا پروتئین کیناز فعال‌کننده میتوزی در سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت موجب شروع مجدد میوز اووسیتی می‌گردند [۹]. افزایش FSH در طول سیکل جنسی، با تحریک گیرنده اختصاصی FSH در سلول‌های گرانولوزا سبب رشد فولیکول‌ها می‌شود. FSH، تکثیر سلول‌های گرانولوزا را در مرحله پره‌آنترال تشدید نموده و سنتز گیرنده‌های هورمون لوتئینیزه‌کننده (LH) را القا می‌کند [۱۰]. از طرفی  $TNF-\alpha$ <sup>۲</sup> یکی از مارکرهای اثرزی فولیکولی به‌شمار می‌رود [۱۱]. اعضاء فوق خانواده نکروزه‌کننده تومور، شناخته شده‌ترین مولکول‌های پیش‌آپوپتوزی مرتبط با مرگ سلول‌های گرانولوزا و اثرزی 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  $TNF-\alpha$  و همچنین بررسی اووسیت‌های اووله 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 ۱۶-۱۴ روزه، 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 ۳۵  $\mu$ l حاوی محیط کشت  $\alpha$ MEM (گیبکو، امارات)<sup>۳</sup> و مکمل‌هایی نظیر FBS ۵٪ (گیبکو، امارات)، ITS ۱٪ (گیبکو، امارات) و FSH ۱۰۰ IU/ml (مرک سرونو، سویس)<sup>۴</sup> منتقل شدند. قابل ذکر است هر کدام از قطره‌ها با ۳۵  $\mu$ l روغن معدنی (سیگما، آمریکا)<sup>۵</sup> پوشش داده شدند.

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

**تعیین قطر فولیکولی مناسب برای کشت اولیه**

به‌منظور انتخاب فولیکول‌های مناسب برای کشت ابتدا اندازه اولیه فولیکول‌های پره آنترال محاسبه شد. به این صورت که فولیکول‌های پره آنترال با عدسی چشمی مدرج زیر میکروسکوپ اندازه‌گیری شد و به سه گروه با سایزهای کوچک (۸۰-۱۳۰)، 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 در نتیجه 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 ( $131-185 \mu\text{m}$ ) که دارای بقا بیش‌تری هستند با غلظت‌های مختلف HBV ( $\mu\text{gr/ml}$ ) 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 ( $1 \mu\text{gr/ml}$ ) 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. اندازه 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 ( $100\times$ ،  $200\times$  و  $400\times$ ) با محاسبه دو قطر عمود بر هم بر حسب  $\mu\text{m}$  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 مرحله پروفاز یک متوقف شده بود، و گذر به مرحله متافاز II است. این رویداد از لحاظ مورفولوژیکی با شکست و زیکول زاینده و آزادسازی اولین گویچه قطبی (معیار تشخیص میوز I) مشخص می‌شود (۱۲).

**بررسی بیان  $\text{TNF-}\alpha$  به روش فلوسیتومتری**

برای بررسی بیان  $\text{TNF-}\alpha$  در سلول‌های گرانولوزای فولیکولی از روش فلوسیتومتری استفاده گردید. در این روش، ابتدا سلول‌های گرانولوزا با تریپسین لیز شده و سپس به میکروتیوب‌های مناسب منتقل گردیده و ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند، پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ مجدد،

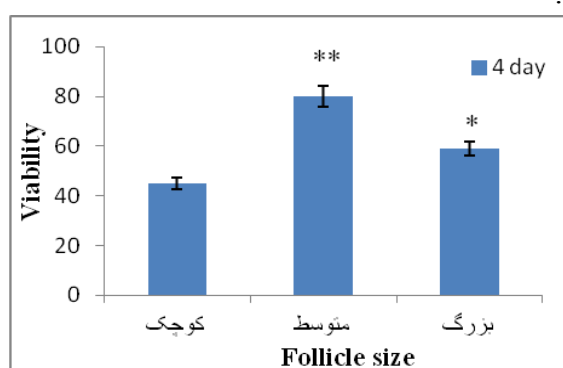
آنتی‌بادی اولیه TNF- $\alpha$  (Ab1793 Abcam) با غلظت 1:100 اضافه گردیده و تمام طول شب در یخچال قرار داده شدند. در روز بعد پس از شستشو و سانتریفیوژ آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC با غلظت ۱:۲۰ اضافه شده و ۴۵ دقیقه در یخچال نگهداری شد. سپس شست و شو و سانتریفیوژ مجدد انجام شده و در نعایت ۳۰۰ میکرولیتر فرمالین ۰/۱ درصد 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<sup>۱</sup> و تست پارامتریک آنوا<sup>۲</sup> آنالیز شده و نمودارها با نرم‌افزار اکسل<sup>۳</sup> رسم شدند. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و  $P \leq 0/05$  معنی‌دار محسوب شد.

### نتایج

نتایج حاصل از تعیین قطر فولیکولی مناسب برای کشت اولیه: در تحقیق حاضر به‌منظور انتخاب فولیکول‌های مناسب برای کشت اولیه ابتدا اندازه 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 اندازه متوسط ( $131-185 \mu\text{m}$ ) با  $P < 0/01$ \*\* میزان بقا بیش‌تری را نسبت به فولیکول‌های کوچک ( $80-130 \mu\text{m}$ ) دارند، در حالی که فولیکول‌های بزرگ ( $186-235 \mu\text{m}$ ) با  $P < 0/05$ \* میزان بقائشان بیش‌تر از فولیکول‌های کوچک است. به همین سبب، برای کشت اولیه از فولیکول‌های با اندازه متوسط ( $131-185 \mu\text{m}$ ) استفاده شد.



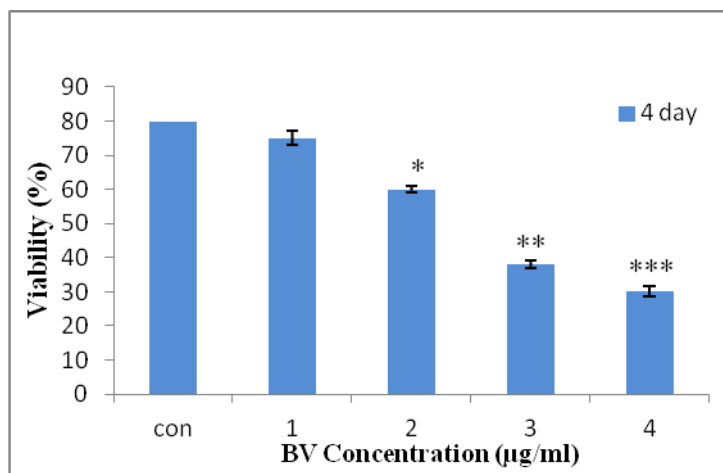
نمودار ۱. میزان بقا گروه‌های مختلف فولیکولی به‌روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو پس از گذشت ۴ روز در کشت اولیه نتایج نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال سایز متوسط ( $131-185 \mu\text{m}$ ) با  $P < 0/01$ \* میزان بقا بیش‌تری نسبت به فولیکول‌های کوچک دارند در حالی که فولیکول‌های بزرگ ( $186-235$ ) با  $P < 0/05$ \* میزان بقائشان بیش‌تر از فولیکول‌های کوچک است میانگین  $\pm$  میزان خطا.

۱. INSTAT3

۲. one-way ANOVA

۳. EXCEL

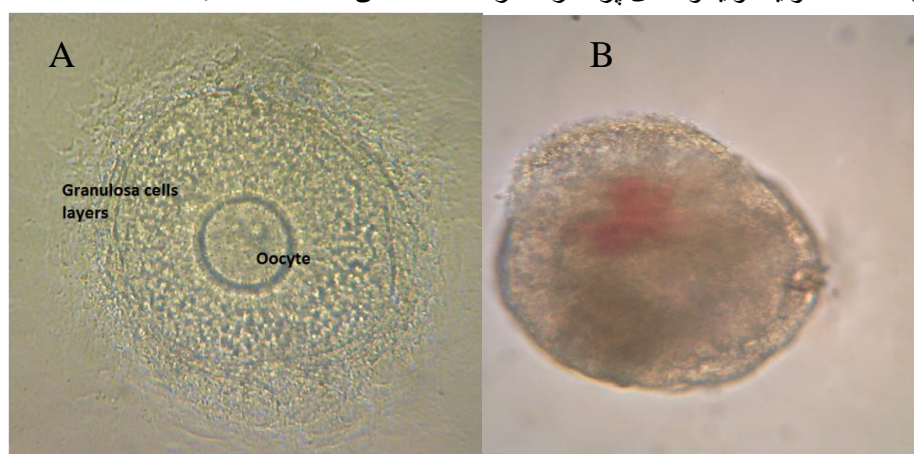
نتایج حاصل از بررسی بقا فولیکول‌ها تحت تیمار با HBV: نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف HBV (۱، ۲، ۳، ۴  $\mu\text{g/ml}$ ) بر بقا فولیکولی (نمودار ۲) نشان داد که دوز  $1 \mu\text{g/ml}$  از HBV دارای کمترین اثر کشندگی بر روی فولیکول‌هاست. در نتیجه این غلظت از HBV دوز مناسبی برای تیمار فولیکول‌ها تشخیص داده شد.



نمودار ۲. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف HBV بر درصد بقا فولیکول‌های پره‌آنترال پس از ۴ روز تیمار بر اساس رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو

نتایج نشان داد که غلظت  $1 \mu\text{g/ml}$  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  $\pm$  میزان خطا.

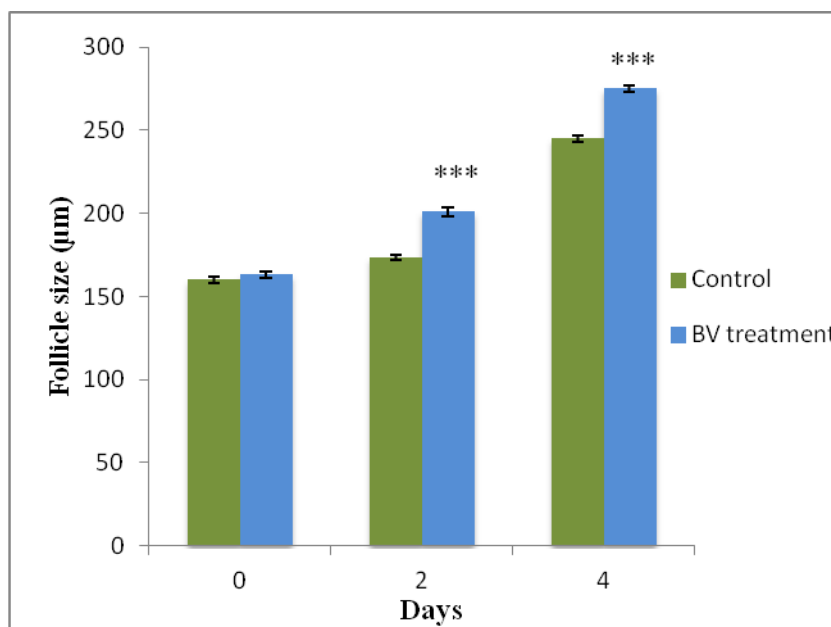
فتومیکروگراف کشت اولیه فولیکول‌های پره‌آنترال در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. فتومیکروگراف میکروسکوپ معکوس مقایسه مورفولوژیکی فولیکول پره‌آنترال در طی کشت اولیه (A) فولیکول پره‌آنترال طبیعی در روز صفر، (B) فولیکول پره‌آنترال در روز چهارم کشت. پراکنندگی سلول‌های گرانولوزا از روز ۴ به بعد امکان اندازه‌گیری قطر فولیکولی را میسر نمی‌سازد. 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

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  $163 \mu\text{m}$  است که نسبت به گروه کنترل ( $160 \mu\text{m}$ ) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. این در حالی است که قطر فولیکولی در گروه کنترل و تیمار با غلظت  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  زهر، در روز دوم کشت اولیه به‌ترتیب برابر  $173/53 \pm 28/71 \mu\text{m}$  و  $201/67 \pm 33/62 \mu\text{m}$  است که حاکی از اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) بین این دو گروه است. در روز چهارم نیز میانگین قطر فولیکولی برای گروه کنترل و گروه تیمار به‌ترتیب  $245/46 \pm 26/54 \mu\text{m}$  و  $275/56 \pm 54/78 \mu\text{m}$  محاسبه شد که این اختلاف با  $p < 0/001$  معنی‌دار است.

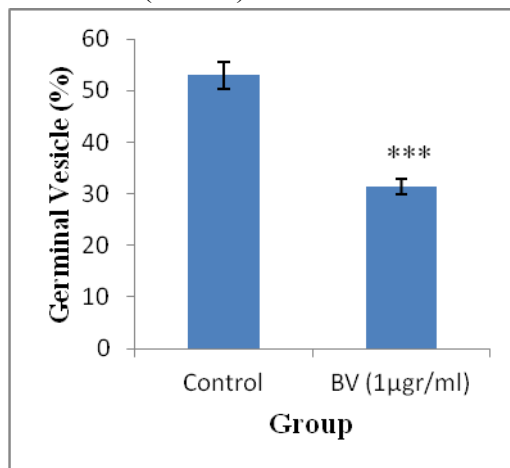


نمودار ۳. نتایج حاصل از مقایسه قطر فولیکولی در روزهای صفر، دوم و چهارم کشت اولیه. تفاوت قطر فولیکول‌های کنترل و تیمار شده در روز صفر کشت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در حالی که روز دوم و چهارم کشت این میزان با  $P < 0/001$  معنی‌دار بود. تعداد تعداد فولیکول: ۱۵۰-۱۲۰ عدد. میانگین  $\pm$  میزان خطا.

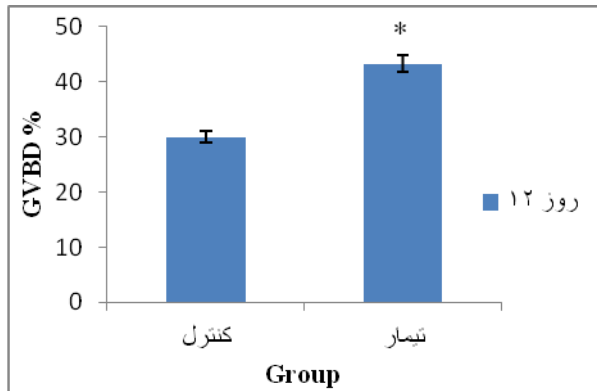
نتایج حاصل از بررسی درصد تخمک‌های GV در نمونه‌های کنترل و تیمار با HBV: در این تحقیق درصد تخمک‌های GV در هر دو گروه کنترل و تیمار پس از چهار روز تیمار با HBV محاسبه شد. نتایج این بررسی میزان تخمک‌های GV را در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ نشان داد که بیان‌گر کاهش معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) آن در در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است (نمودار ۴).

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

حباب زاینده دچار شکست می‌شود GVBD<sup>۱</sup> 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 حدود ۳۰٪ و ۴۳/۲٪ است (نمودار ۵).



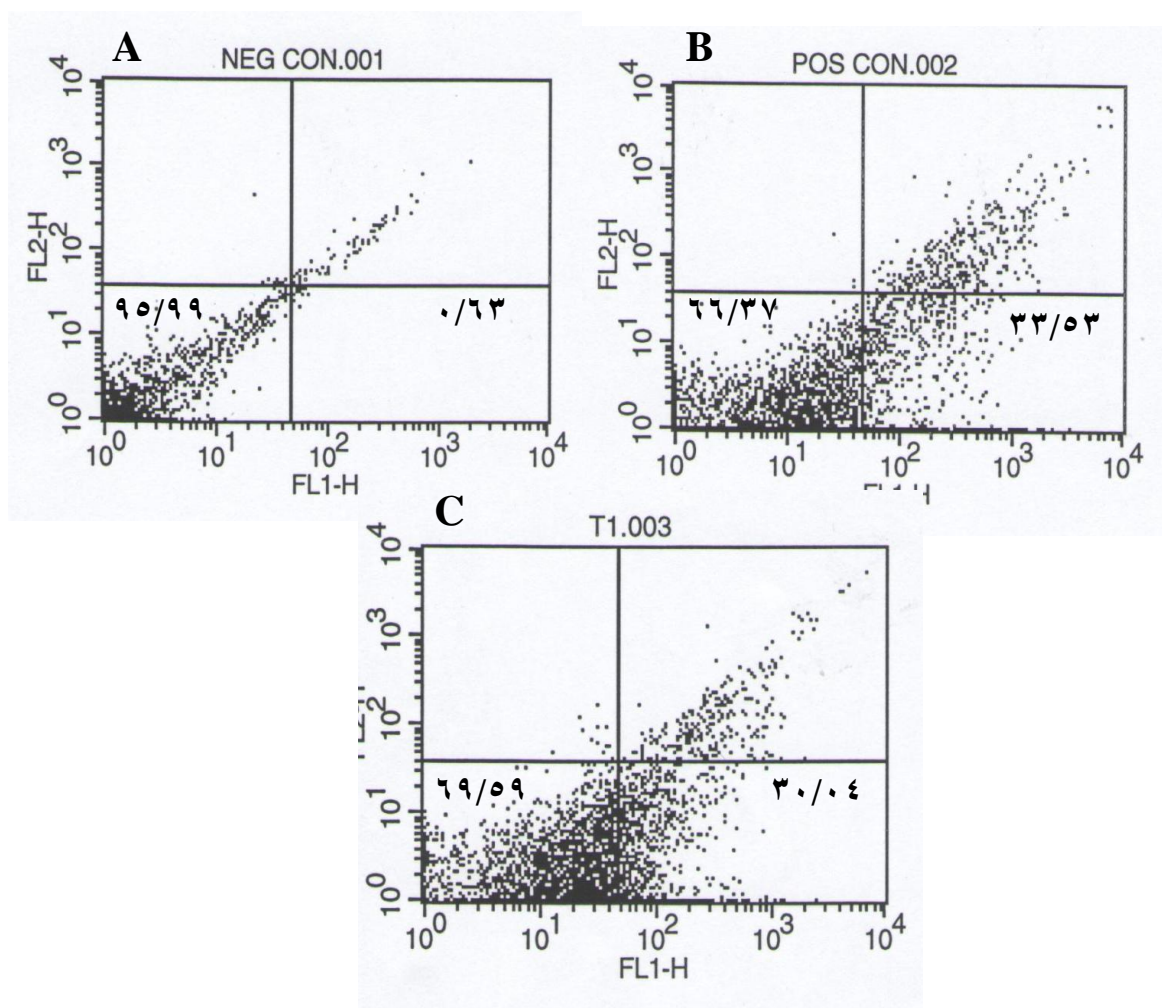
نمودار ۴. نتایج حاصل از درصد تخمک‌های GV در دو گروه کنترل و تیمار پس از گذشت چهار روز از کشت اولیه. نتایج این بررسی میزان تخمک‌های GV را در گروه کنترل و تیمار به‌ترتیب ۵۳٪ و ۳۱/۴٪ نشان داد که بیان‌گر کاهش معنی‌دار  $p < 0/001$  \*\*\* آن در در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است. تعداد فولیکول: ۱۵۰-۱۲۰ عدد. میانگین ± میزان خطا



نمودار ۵. 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 نمونه تیمار شده با HBV حدود ۴۳/۲٪ برآورد شد که با  $P < 0/05$  \* معنی‌دار است. میانگین ± میزان خطا

نتایج حاصل از بررسی بیان TNF- $\alpha$  به‌روش فلوسیتومتری: در روش فلوسیتومتری که برای بررسی بیان در سطح پروتئین به‌کار می‌رود، نتایج حاصل از بیان TNF- $\alpha$  در نمونه کنترل مثبت ۳۳/۵۳ درصد و در نمونه تیمار ۳۰/۰۴ برآورد شد (شکل ۲).

۱. germinal vesicle break down



شکل ۲. آنالیز فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر بیان  $TNF-\alpha$  در مدت ۴ روز بعد از کشت در نمونه تیمار شده. محدوده تقسیم ۱/۴ بالا و پایین سمت راست میزان بیان  $TNF-\alpha$  را نشان می‌دهد (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<sup>۱</sup>، فسفولیپاز A2 (PLA2)، هیالورونیداز، آپامین، پپتید دگرانوله‌کننده ماست سل‌ها<sup>۲</sup>، پروکامین<sup>۳</sup>، سکاپین<sup>۴</sup>، ترتیپین<sup>۵</sup> 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

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 ۱ mg/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- $\alpha$  سیتوکینی غیرگلیکوزیله است که مشخص شده است نقش مهمی را در عمل‌کرد تخمدانی ایفا می‌کند، طبق گزارشی، ترشح موضعی TNF- $\alpha$  می‌تواند سبب آپوپتوز جسم زرد و آترزی فولیکولی گردد. حضور TNF- $\alpha$  mRNA در انواع سلول‌های تخمدانی نظیر ماکروفاژها، اووسیت، سلول‌های لوتئال و گرانولوزا در گونه‌های مختلف گزارش شده است. اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های غشای سلولی اعمال می‌کند [۱۹]. TNF- $\alpha$  اثرات ممانعتی بر روی استروئیدسازی و فولیکول‌سازی دارد که مرتبط با چندین پاسخ التهابی است [۲۰]. در پستانداران TNF- $\alpha$  در تخمدان بر روی تمایز، تکثیر، تولید استروئید، التهاب و القاء آپوپتوز از طریق گیرنده‌های اختصاصی‌اش عمل می‌کند و به‌عنوان واسطه تخمک‌گذاری از طریق نقش تحریکی آن بر روی آپوپتوز فولیکولی و شکست ماتریکس خارج سلولی در دیواره فولیکول است [۲۱]. TNF- $\alpha$  یکی از مارکرهای آترزی 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- $\alpha$  را در سلول‌های گرانولوزا کاهش دهد. کی‌یانگ‌وود کیم<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر سرکوب‌کنندگی زهر زنبور را بر پاسخ ایمنی به التهاب مفاصل را بررسی کردند و نتیجه این پژوهش نشان داد به‌کارگیری زهر زنبور عسل، تولید مفرط چندین سیتوکین نظیر: IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ناشی از آرتریت را کاهش می‌دهد [۲۲]. پارک<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثرات سرکوب‌کننده HBV را بر روی TNF- $\alpha$  در سلول‌های کبدی بررسی و اثبات کرد که HBV اثر مهارکنندگی TNF- $\alpha$  در سلول‌های کبدی دارد [۱۸]. نتایج تحقیق حاضر نیز نتایج به‌دست آمده پارک و همکاران را تأیید کرد و نشان داد که HBV در غلظت اندک ۱  $\mu$ gr/ml می‌تواند بیان TNF- $\alpha$  را کاهش دهد.

۱. Kyung-Woon Kim

۲. Park

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که زهر زنبور عسل سبب افزایش معنی‌داری در سیر بلوغ آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال 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- $\alpha$  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 پروژه 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, "Comparative study between bee venom and gonadotropine for follicular development of immature rats Fertility and Sterility", 80(2003) 264-265.

7. A. F. M. Ali, B. Fateen, A. Ezzet, H. Badawy, A. Ramadan, A. El-tobge, "Laparoscopic intravarian 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 Crespo<sup>1</sup>, 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.

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- $\alpha$ -induced hepatic cell damage via inhibition of pro-inflammatory cytokine production and NF- $\kappa$ B 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- $\alpha$  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- $\kappa$ B 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.