بررسی تأثیر توأم متفورمین و زهرزنبور بر بلوغ آزمایشگاهی فولیکولهای پره آنترال موش

مهناز آذرنیا*، محمد نبیونی، هما محسنی کوچصفهانی و علی طوسی

تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

چکیده

متفورمین سالهاست که جهت کنترل دیابت نوع ۲ استفاده می شود. این دارو همچنین در بهبود بیماران سندرم پلی کیستیک تخمدان(PCOS)، اعاده سیکلهای قاعدگی و القای اوولاسیون مؤثر بوده است. مطالعات نشان می دهد متفورمین از طریق فعال کردن پروتئین کیناز فعال شونده توسط آدنوزین مونو فسفات(AMPK) می تواند موجب پیشروی بلوغ میوزی تخمکهای موش در محیط *in vitro* گردد. زهرزنبور ترکیبی پیچیده از آنزیمها، پروتئین، پپتید و سایتوکین ها است. مطالعات *in vivo* ما در تحقیقات قبلی حاکی از اثرات درمانی زهرزنبور بر بیماران PCOS و تکوین فولیکولهای تخمدان می باشد. با فرض تأثیر این دو بر رشد و میزان ماندگاری فولیکولهای تخمدان موش و نیز نرخ بلوغ تخمکها هدف این تحقیق بررسی اثر توأم متفورمین و زهرزنبور بوده است. بدین منظور فولیکولهای نابالغ از تخمدان موشهای ۱۴ روزه خارج و در محیط کشت قطره ای α-MEM تحت روغن مینرال به مدت ۱۴ روز کشت داده شد. متفورمین و زهرزنبور به طور جداگانه و نیز به صورت همزمان به محیط کشت فولیکول اضافه شد. قطر فولیکولها تا روز چهارم کشت و نیز میزان ماندگاری آنها به صورت هر دو روز یکبار بررسی و مورد سنجش میکروسکوپی قرار گرفتند. در روز دوازدهم به منظور القای اوولاسیون از hCG و rEGF استفاده شد و وضعیت تخمکهای اوولاه شده بررسی گردید. یافته ها نشان داد که قطر فولیکولها در روز دوم کشت در اثر تیمار با متفورمین($P <۰/۰۱$) ، زهرزنبور($P <۰/۰۵$) و در گروه توأم ($P <۰/۰۵$) به طور معنی داری افزایش یافت. در روز چهارم کشت نیز رشد فولیکولها در گروه متفورمین ($P <۰/۰۰۱$)، زهرزنبور($P <۰/۰۵$) و در گروه توأم ($P <۰/۰۱$) افزایش معنی داری را نشان داد. درصد ماندگاری فولیکولها در هیچکدام از گروههای تیمار شده معنی دار نبود. درصد تخمکهای GV در گروه متفورمین($P <۰/۰۰۱$) ، زهرزنبور($P <۰/۰۱$) و در گروه تیماری توأم ($P <۰/۰۱$) به طور معنی داری کاهش یافت و در مقابل بر تعداد تخمکهای MI و MII (مرحله متافاز I و II) در هر سه گروه تیماری افزوده شد؛ هرچند که این افزایش معنی دار نبود. در ضمن اختلاف معنی داری در میزان تشکیل حفره آنتروم میان گروهها مشاهده نشد. بنابراین یافته های این تحقیق می تواند مؤید تأثیر همزمان متفورمین و زهر زنبور بر افزایش رشد فولیکولهای تخمدان در محیط *in vitro* و نیز افزایش پیشروی و بلوغ میوزی تخمک باشد که بر روی هم موجب آمادگی بیشتر آن برای لقاح می شود.

واژه های کلیدی: زهر زنبور، فولیکولهای پره آنترال، متفورمین، کشت و بلوغ آزمایشگاهی فولیکولهای تخمدان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۳۰۴۵۵۶ ، پست الکترونیکی: azarnia@khu.ac.ir

مقدمه

فولیکولوژنزیس تخمدانی، فرآیندی پویا بوده که با تقسیم و تمایز قابل ملاحظه سلولهای سوماتیک یعنی سلولهای گرانولوزا مشخص می شود. فولیکول در حال تکوین، محیطی مناسب و مطلوب را جهت بلوغ تخمک فراهم می آورد(۷). هدف اصلی اووژنزیس، تولید تخمک شایسته از نظر رشدونموی با قابلیت باروری است. تخمک برای حصول باروری نیاز به ظرفیت از سرگیری میوز و قابلیت تکمیل آن تا مرحله ی متافاز II (بلوغ هسته ای) دارد. در

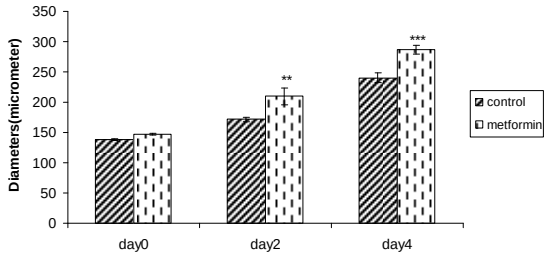
طول دوره جنینی، تخمک بدوی که خود حاصل تقسیمات میتوزی اووگونی است وارد میوز شده اما در مرحله دیپلوتن اولین تقسیم میوزی یعنی مرحله ژرمینال وزیکول متوقف می شود(۱۹). بلوغ میوزی(بلوغ هسته ای) فرآیندی دو مرحله ای است که ابتدا تخمک اولیه، میوز را از سر گرفته و در متافاز تقسیم دوم میوزی متوقف می شود و در مرحله دوم تخمک ثانویه حاصل، در هنگام اوولاسیون و در صورت قرار گرفتن در معرض اسپرم، دومین تقسیم میوزی خود را تکمیل نموده و تخمک بالغ را پدید می آورد (۲۴). امروزه کشت آزمایشگاهی تخمک (*in vitro* maturation) یکی از مؤثرترین روشها در درمان اختلالات باروری بوده و گامی مؤثر جهت کمک به بیمارانی چون مبتلایان به پلی کیستیک تخمدان و یائسگی زودرس است. متفورمین دارویی ضد دیابت از دسته ی (بای گوانیدها) است که به طور گسترده ای به عنوان یک فاکتور حساس کننده به انسولین، در کنترل دیابت نوع ۲ مصرف می شود (۱۵). متفورمین گلوکونئوژنز را می کاهد، که به کاهش برون دهی گلوکزی کبد می انجامد. سایر فعالیتهای فارماکولوژیکی متفورمین، شامل افزایش اکسیداسیون گلوکز و ذخیره آن به صورت گلیکوژن و چربی است و نیز این دارو موجب مهار اکسیداسیون اسیدچرب می گردد. متفورمین جذب روده ای گلوکز را کاهش می دهد که به نرمال سازی میزان گلوکز خون کمک می کند(۲۶). اثرات متعدد متفورمین در اکثر بیماران PCOS منجر به کاهش مقادیر آندروژن محیطی، اعاده سیکلهای قاعدگی و افزایش میزان اوولاسیون خود به خودی و تحت القای کلومیفن سیترات شده است (۱۷ و ۲۱). متفورمین می تواند فعالیت گیرنده تیروزین-کینازی انسولین را در انواع مختلف سلولها تغییر دهد(۱۴). متفورمین همچنین موجب بهبود تنظیم سیکل قاعدگی، افزایش پاسخ دهی تخمدان به درمان با کلومیفن سیترات و القای اوولاسیون می گردد(۲۱ و ۲۵). بهبودی حاصل از تجویز متفورمین به افزایش حساسیت به انسولین، کاهش مقادیر انسولین و متعاقب آن کاهش وضعیت هایپرآندروژنیک نسبت داده می شود.

زهر زنبور عسل شامل تنوعی از پپتیدها (شامل ملیتین، آپامین، سکاپین، MCDP ، ترتیاپین، آدولاپین)، آنزیمها (فسفولیپاز A2 ، هیالورونیداز،اسید فسفومنواستراز، لیزوفسفولیپاز)، آمینهای فعال (هیستامین، دوپامین، نوراپی نفرین و سروتونین) و ترکیبات دیگر می باشد(۵). مطالعات قبلی انجام شده توسط مؤلفین این مقاله (۱) و دیگر محققین نشان داده است که زهرزنبور در پیشروی تکوین فولیکولهای تخمدان در محیط *in vivo* ، درمان PCOS، درمان انسداد مجاری رحم و بهبود نتایج IVF مؤثر است (۲، ۳، ۴، ۵ و ۶). با توجه به اثر مثبت داروی متفورمین، در القای اوولاسیون و رشدونمو فولیکولهای تخمدان، در بیماران و تحت شرایط *in vivo* و *in vitro* و با توجه به اثر مستقیم زهرزنبور عسل بر رشد و بلوغ فولیکولهای تخمدان و تخمکها در شرایط *in vivo* در این تحقیق تأثیر توأم این دو به عنوان هدف اصلی کار انتخاب گردید تا هم افزایی آنها مورد بررسی قرار گیرد.

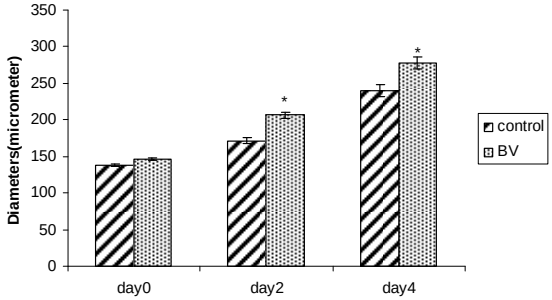
مواد و روشها

موشهای نژاد NMRI با سن ۱۴ روز انتخاب و به روش جابه جایی مهره های گردن کشته شدند. در محیط استریل موشها باز شده و تخمدانها جدا و در محیط کشت قطره ای α-MEM حاوی FBS 5% تحت روغن مینرال قرار گرفتند. فولیکولهای جدا شده از نظر داشتن تخمک گرد و مرکزی و داشتن لایه های سلولهای گرانولوزا، غشای گرانولوزا و لایه ظریف سلولهای تکا و نیز قطر مناسب در زیر میکروسکوپ معکوس تحت بررسی قرار گرفتند. فولیکولهای مناسب، برداشته شده و به قطره های جدید حاوی محیط کشت α-MEM و تمامی مکملها (FBS 5% ، ITS 1% ، FSH 100 mIU/ml) و در زیر روغن مینرال منتقل شدند. سپس ظروف کشت حاوی فولیکولها به مدت ۱۲ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 5%

نگهداری شدند (۸ و ۲۲). قطر فولیکولها در روزهای صفر، دوم و چهارم کشت توسط اکولر مدرج، با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ معکوس و با محاسبه دو قطر عمود بر هم بر حسب میکرومتر تعیین شد (۸). با استفاده از تریپان بلو ۰/۴ درصد فولیکولهای دژنره، آسیب دیده و زنده بر اساس شدت رنگ پذیری تعیین شدند و پس از پایان این مرحله و جمع بندی نتایج حاصله مناسب ترین اندازه فولیکولی جهت مطالعات بعدی اندازه بین ۱۲۰ تا ۱۷۰ میکرومتر در نظر گرفته شد. دژنره شدن فولیکولها توسط فاکتورهایی نظیر میزان رشد و پراکندگی سلولهای گرانولوزا، تیرگی و روشنی سلولهای گرانولوزا، چسبندگی فولیکولها به ظرف کشت، وجود فضاهای مملو از مایع، تشکیل حفره آنتروم و عدم اوولاسیون زودهنگام، در طی ۱۲ روز از کشت به صورت هر دو روز یکبار، در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد (۲۰). جهت القای تخمک گذاری و بلوغ تخمک، در روز دوازدهم، محیط قطره ها با محیط حاوی hCG 1.5 IU/ml و rEGF 20 ng/ml تعویض شد (۱۱ و ۲۲) و ۱۶ تا ۴۸ ساعت بعد، چگونگی بلوغ تخمکهای اوله شده بررسی گردید (۲۳). با توجه به اینکه هدف اصلی بررسی اثر همزمان زهر و متفورمین بوده است؛ غلظت مناسب برای متفورمین به منظور بلوغ آزمایشگاهی تخمک، غلظت M $۱۰^{-۵}$ در نظر گرفته شد(۱۶)؛ و از بین دُزهای مختلف زهر زنبور پس از انجام آزمایشهای دُزسنجی، غلظت ۱ μg/ml برای آزمایش در این تحقیق مناسب تشخیص داده شد. تغییرات قطر فولیکول در روزهای دوم و چهارم کشت، میزان بقا، دژنراسیون، تشکیل آنتروم و تعداد تخمکهایGV، MI و MII به دست آمده در هر گروه و بین گروهها، با آزمون one way Anova در داخل گروه و بین گروهها سنجیده شد. از نظر آماری در آزمون های فوق (P< ۰/۰۵) معنی دار محسوب شد. برای آنالیز آماری و رسم نمودارها به ترتیب از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد.



نمودار۱- مقایسه قطر متوسط فولیکولها بین گروههای کنترل و متفورمین در روزهای دوم و چهارم کشت که حاکی از رشد معنی دار فولیکولها در گروه متفورمین نسبت به گروه کنترل است.
(Mean ±SEM) (**P<0.01, ***P<0.001)

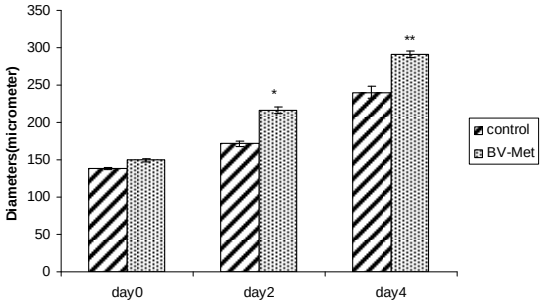


نمودار ۲- مقایسه قطر متوسط فولیکولها بین گروههای کنترل و زهرزنبور(BV) در روزهای دوم و چهارم کشت که حاکی از رشد معنی دار فولیکولها در گروه زهرزنبور نسبت به گروه کنترل است.
(Mean ±SEM) (*P<0.05) BV = Bee venom

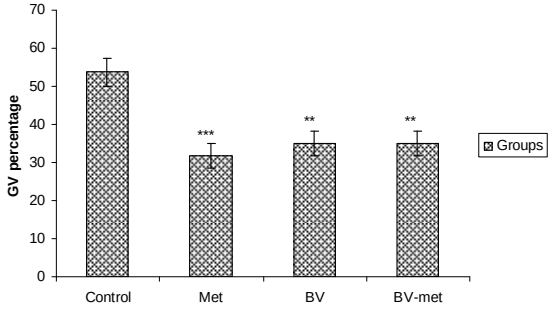
نتایج

قطر فولیکولها به مدت ۴ روز در گروه کنترل و گروههای تیماری متفورمین، زهرزنبور و هم افزایی متفورمین با زهرزنبور سنجیده شد. قطر متوسط فولیکولهای گروه کنترل در روز دوم کشت برابر μm ۱۷۱/۵۲±۲۹/۷۳ و در گروه متفورمین برابر μm ۲۰۹/۶۷±۱۴/۴ می باشد که حاکی از اختلاف معنی دار(P <۰/۰۱) میان این دو گروه است. همچنین قطر متوسط فولیکولهای گروه کنترل در روز چهارم کشت برابر μm ۲۳۹/۹۷±۶۵/۸۴ و در گروه متفورمین برابر μm ۲۸۶/۵۷±۶۶/۸۲ بود که اختلافی معنی دار(P <۰/۰۰۱) میان این دو گروه را نشان می دهد(نمودار ۱). قطر متوسط فولیکولهای گروه زهرزنبور در روز دوم کشت برابر μm ۲۰۶/۶۴±۳۴/۵۱ بود که حاکی از اختلاف معنی دار(P <۰/۰۵) بین این گروه با گروه کنترل است. همچنین قطر متوسط فولیکولهای گروه زهرزنبور در روز

چهارم کشت برابر ۲۷۷/۴۳±۶۱/۹۹ µm بوده که بیانگر تفاوتی معنی دار(P <۰/۰۵) میان این گروه با گروه کنترل است (نمودار ۲). قطر متوسط فولیکولهای گروه هم افزایی متفورمین-زهرزنبور در روز دوم کشت برابر ۲۱۵/۸۹±۲۷/۱۶ µm بود که حاکی از اختلاف معنی دار(P <۰/۰۵) بین این گروه با گروه کنترل است. همچنین قطر متوسط فولیکولهای گروه هم افزایی متفورمین-زهرزنبور در روز چهارم کشت برابر ۲۹۱/۶۱±۲۶/۳۴۹ µm بوده که بیانگر تفاوتی معنی دار(P <۰/۰۱) میان این گروه با گروه کنترل است(نمودار ۳). بین گروههای تیماری، از نظر تفاوت در قطر متوسط فولیکولها، هیچ اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درصد زنده ماندن فولیکولها در گروه کنترل (۶۴/۱۰ درصد)، گروه متفورمین (۷۱/۱۱ درصد)، گروه زهر زنبور (۵۹/۰۹ درصد) و گروه هم افزایی متفورمین-زهرزنبور (۶۴/۸۳ درصد) است که در هیچ گروهی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری دیده نشد. درصد ماندگاری در گروههای تیماری متفورمین و هم افزایی متفورمین-زهرزنبور افزایش و در گروه تیماری زهرزنبور کاهش یافته بود و بنابراین بین گروه تیماری متفورمین، با گروه تیماری زهرزنبور تفاوت معنی دار بود(P <۰/۰۵). درصد تشکیل آنتروم در گروه کنترل (۴۶ درصد)، در گروههای تیماری متفورمین(۴۸/۴۳ درصد)، گروه زهرزنبور(۴۴/۲۳ درصد)، و گروه متفورمین-زهرزنبور(۴۶ درصد) است که هیچ اختلاف معنی داری میان گروهها دیده نشد. درصد تخمکهای GV مشاهده شده در گروه کنترل (۵۲ درصد)، در گروههای تیماری متفورمین (۳۱/۲۵ درصد)، گروه زهرزنبور(۳۴/۶۱ درصد) و گروه متفورمین-زهرزنبور (۳۳/۹ درصد) بود (جدول ۱). درصد بقای GV در گروه تیماری متفورمین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت (P <۰/۰۰۱) (نمودار ۴). درصد بقای GV در گروههای زهرزنبور و گروه هم افزایی زهرزنبور-متفورمین نیز نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت(P <۰/۰۱) (نمودار ۴). درصد تکوین هسته ای و پیشروی تخمکهای فولیکولها تا مرحله MI در گروه کنترل(۳۲٪)، گروه متفورمین(۴۵/۳۱٪)، گروه زهر زنبور(۴۴/۲۳ درصد) و گروه هم افزایی متفورمین-زهر زنبور(۴۲/۳۷ درصد) بوده است(جدول۱). درصد تکوین هسته ای تخمک تا مرحله ی MI در هر سه گروه تیماری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما این اختلاف معنی دار نبود. بین گروههای تیماری نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد. درصد تکوین هسته ای و پیشروی تخمکهای فولیکول تا مرحله ی MII در گروه کنترل(۱۶٪)، گروه متفورمین(۲۳/۴۴ درصد)، گروه زهرزنبور(۲۱/۱۵ درصد) و گروه هم افزایی متفورمین-زهرزنبور(۲۳/۷۳ درصد) است. درصد تکوین هسته ای تخمک تا مرحله ی MII در هر سه گروه تیماری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما این اختلاف معنی دار نبود. بین گروههای تیماری نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱).



نمودار ۳- مقایسه قطر متوسط فولیکولها بین گروه کنترل و گروه هم افزایی متفورمین-زهرزنبور(BV-Met) که حاکی از رشد معنی دار فولیکولها در گروه هم افزایی نسبت به گروه کنترل است. BV-Met = Bee venom-Metformin (Mean ±SEM) (*P<0.05, **P<0.01)



نمودار ۴- مقایسه درصد بقای تخمک GV در بین گروههای مورد

مطالعه که حاکی از کاهش معنی دار میزان تخمک های GV در همه گروههای تیماری نسبت به گروه کنترل است. Met = Metformin BV = Bee venom BV-met = Bee venom-metformin (Mean ±SEM) (**P<0.01, ***P<0.001)

جدول ۱- تکوین فولیکولهای کشت شده در گروههای مختلف مورد مطالعه (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) درصد ماندگاری(درصد فولیکول زنده) بین گروههای (متفورمین) و(زهرزنبور) معنی دار بوده است و نیز درصد تخمکهای GV با گروه (کنترل) مقایسه شده است.

گروه	تعداد کل	زنده تعداد(درصد)	دژنره تعداد(درصد)	تشکیل آنتروم تعداد(درصد)	GVتخمک تعداد درصد	MI تخمک تعداد(درصد)	MIIتخمک تعداد(درصد)
کنترل	۷۸	۵۰(۶۴/۱۰)	۲۸(۳۵/۹)	۲۳(۴۶)	۲۶(۵۲)	۱۶(۳۲)	۸(۱۶)
متفورمین(Met)	۹۰	* ۶۴(۷۱/۱۱)	۲۶(۲۸/۸۹)	۳۱(۴۸/۴۳)	*** ۲۰(۳۱/۲۵)	۲۹(۴۵/۳۱)	۱۵(۲۳/۴۴)
زهرزنبور(BV)	۸۸	۵۲(۵۹/۰۹)	۳۶(۴۰/۹۰)	۲۳(۴۴/۲۳)	** ۱۸(۳۴/۶۱)	۲۳(۴۴/۲۳)	۱۱(۲۱/۱۵)
متفورمین- زهرزنبور(Met-BV)	۹۱	۵۹(۶۴/۸۳)	۳۲(۳۵/۱۶)	۴۲(۴۶)	** ۲۰(۳۳/۹)	۲۵(۴۲/۳۷)	۱۴(۲۳/۷۳)

بحث

کیفیت و ساختار تخمک در فرآیند لقاح از اهمیت خاصی برخوردار است. در پستانداران بلوغ تخمک، توسط توقف یا تداوم تقسیم میوز شناخته می شود. در طی بلوغ هسته ای، تخمکهای نابالغ دستخوش (GVBD) شده و به سوی متافازمیوز II (MII) پیش می روند. پیشروی و بلوغ میوزی توسط فاکتورهای گوناگونی تنظیم می شود؛ از جمله آنها پروتئین کینازها هستند که فرآیند سلولی را توسط فسفریلاسیون تنظیم و تعدیل می کنند. این کینازها شامل MAPK3/MAPK1 یا MAPK3/1 است. برای مثال فعالیت MAPK1، بلوغ تخمک را در مرحله MII افزایش می دهد. cAMP تنظیم کننده ای مهم برای بلوغ میوزی است. همچنین cAMP به 5'-AMP تبدیل می شود، که AMPK را فعال می کند(۱۰). در موش، فعالیت AMPK ، تداوم تقسیم میوز در تخمکها را تحریک کرده که حاکی از نقش کلیدی کینازها در بلوغ تخمک است(۹ و ۱۲). مطالعات Lee و همکاران نشان داد که هم افزایی متفورمین و انسولین، موجب افزایش بلوغ آزمایشگاهی تخمک و بالا رفتن میزان تشکیل بلاستوسیست در محیط *in vitro* می شود (۱۶). به نظر می رسد متفورمین از طریق اثر مستقیم بر مکانیسمهای مولکولی داخل سلولی تخمک و هم چنین اثراتی که بر سلولهای کومولوس می گذارد؛ به طور غیر مستقیم بر تخمک اثر کرده و موجب بهبود کیفیت (شایستگی رشد و نموی)آن می گردد. اثر انسولین بر روی سلولهای تخمدانی کشت داده شده شامل تحریک تکثیر سلول گرانولوزا و تولید پروژسترون از سلولهای گرانولوزا

و تکا می باشد. بدین ترتیب، انسولین پتانسیل رشدونموی تخمکها را بالا می برد و متفورمین فعالیت انسولین را در طی IVM و IVC [۳] می افزاید. متفورمین از طریق افزایش تولید گلوتاتیون به عنوان عامل از بین برنده رادیکالهای آزاد توانسته است موجب تأثیر بر تخمک شده و بلوغ آن را القاء نماید(۱۶).

Sonntag و همکاران در تحقیق خود شاهد افزایش معنی دار قابلیت حیات سلولهای گرانولوزا در اثر تیمار متفورمین بوده اند؛ که در اثر کاهش حساسیت سلولها به آپوپتوز می باشد (۲۳) و در تحقیق حاضر نیز میزان ماندگاری فولیکولها در گروه تیماری متفورمین افزایش یافت هر چند که این میزان معنی دار نبوده است. فعالیت AMPK ، پیشروی تقسیم میوز و بلوغ میوزی را در تخمکهای موش تحریک می کند. بر روی هم رفته، AMPK فعال موجود در تخمکها، یک سیگنال القا کننده میوزی در محیط *in vitro* شمرده می شود (۹ و ۱۳). متفورمین در موش موجب فعالیت AMPK می شود. AMPK در موش به عنوان القا کننده پیشروی و بلوغ میوزی عمل می نماید. زمان بندی پیشروی میوز در موش، شاید دلیلی بر این مدعا باشد. پیشروی میوزی (GVBD) ، در موش، در طی IVM بسیار زود(در مدت ۲ ساعت) روی می دهد(۱۳). در مطالعه Mansfield و همکاران، مشخص گردید که متفورمین با تأثیر مستقیم بر سلولهای کومولوس در محیط کشت، موجب خاموشی ژنهای تولید کننده استروئیدها شده و همچنین باعث کاهش تولید OMI در این سلولها می شود؛ بدین طریق متفورمین باعث پیشبرد و تسریع بلوغ تخمک می گردد (۱۸). روی هم رفته از نتایج محققین می توان نتیجه گرفت که متفورمین در موش، از طریق فعالیت AMPK موجب تسریع و پیشبرد تداوم میوزی و ورود به GVBD می شود، که این موضوع با یافته های این تحقیق که حاصل از مطالعات سلولی و میکروسکوپی می باشد سازگار است. متفورمین با کاهش معنی دار درصد تخمکهای GV همراه بود و از سویی دیگر موجب افزایش درصد تخمکهای MI و MII شد. همچنین متفورمین سبب افزایش رشد معنی دار فولیکولها در روزهای دوم و چهارم کشت شده است که خود حاکی از نقش مثبت متفورمین در تکوین فولیکولهای تخمدان است. از این نتایج این طور بر می آید که متفورمین در محیط *in vitro* نیز با اثر مستقیم خود سبب رشد فولیکولها، افزایش ماندگاری آنها، القای پیشروی و بلوغ میوزی تخمک و در نهایت آمادگی بیشتر آنها برای لقاح می گردد. در پژوهشی که از تزریق درون تخمدانی زهرزنبور به روش لاپاروسکوپی، برای درمان بیماران PCOS استفاده شد؛ از میزان LH ، اندروستندیون و تستوسترون کاسته شد که بیانگر بهبود بیماری است. هم چنین در اثر تیمار این زهر، اوولاسیون در ۷۵ درصد از آنها القاء شد و بارداری در ۵۰ درصد بیماران روی داد(۳) . از ترکیبات زهر زنبور به ویژه ملیتین و آپامین، به دلیل دارا بودن اثر تحریکی بر استروژن و پروژسترون در لوله فالوپ؛ می توان به منظور درمان ناباروری ناشی از انسداد مجاری فالوپ استفاده کرد. زهر زنبور میزان باروری و درمان انسداد مجاری فالوپ را بهبود بخشید(۴) . در آزمایشی دیگر مشاهده شد که زهر زنبور نسبت به گنادوتروپین ها، اثر بیشتری در افزایش وزن تخمدان و نیز تعداد فولیکولهای پره آنترال دارد. بنابراین اثر زهرزنبور بر رشدونمو فولیکولی رتها، بیشتر از گنادوتروپین ها می باشد(۵). یافته های این تحقیق نیز حکایت از رشد معنی دار فولیکولهای تحت تیمار زهرزنبور، کاهش معنی دار تخمکهای GV و افزایش بیشتر تخمکهای MI و MII دارد که حاکی از نقش مثبت زهرزنبور بر تکوین فولیکولها و بلوغ بیشتر تخمک است. اما باید یادآور شد که میزان ماندگاری فولیکولها به طور غیر معنی داری کاهش یافت که ممکن است در اثر خواص آپوپتوتیک و لیزکنندگی زهرزنبور باشد. زهر زنبور غنی از سایتوکین است که یکی از عمده ترین آنها (GM-CSF) است. سایتوکین های تولید شده توسط تخمدان، از طریق مکانیسمهای اتوکرین و پاراکرین، عملکرد گنادوتروپین ها را تنظیم و تعدیل

می کنند که در جهت تقویت یا تضعیف فعالیت آنها است. در تحقیقی، اثر زهر زنبور بر رشدونمو فولیکولی رتهای نابالغ بررسی شد. یافته ها نشان داد که وزن تخمدان در اثر زهر زنبور ۲۵ درصد افزایش یافت. همچنین تعداد فولیکولهای بزرگ تا ۶/۹ برابر و نیز اثر بر فولیکولهای بدوی و اولیه تا ۳/۹ برابر افزایش نشان داد. بنابراین زهر زنبور تکوین فولیکولهای بدوی، اولیه و پره آنترال را به پیش می برد و در تمایز و بلوغ سلولهای فولیکولی نقش مهمی ایفا می کند و می توان از آن به عنوان دارویی جدید جهت القای اوولاسیون استفاده کرد(۶) . در پژوهشی دیگر، Ali و همکاران اثر زهرزنبور را بر IVF بررسی کردند. زنانی که حداقل سه IVF ناموفق داشتند که به بارداری منجر نشده بود، تحت تیمار زهرزنبور قرار گرفتند. از میان زنان بیمار، ۵۷ درصد باردار شدند که ۷۵ درصد از بارداریها به تولد زنده انجامید. (۲) . در گروه هم افزایی متفورمین و زهرزنبور دیده شد که این دو ترکیب در کنار هم موجب رشد معنی دار فولیکولها نسبت به گروه کنترل شدند اما با مصرف تنهای هر کدام از آنها اختلاف معنی داری نداشت. همچنین بر خلاف تیمار زهرزنبور، در گروه هم افزایی، کاهش ماندگاری وجود نداشت و درصد بقا تا حدودی بالا رفت. درصد تخمکهای GV نیز به میزان معنی داری کاهش و درصد تخمکهای MI و MII افزایش یافت هر چند که این افزایش معنی دار نبود. اما بر روی هم این یافته ها حاکی از بلوغ و آمادگی بیشتر فولیکول و تخمکها برای لقاح است. به نظر می رسد متفورمین هنگامی که با زهرزنبور همراه می شود موجب کاهش اثرات آپوپتوتیک زهر شده و نسبت به تیمار تنهای زهرزنبور میزان ماندگاری را افزایش می دهد، هر چند که معنی دار نیست.

منابع

۱- محسنی کوچصفهانی هما، نبیونی محمد، ادهم حامد. ۱۳۸۸، بررسی اثر سم زنبور عسل بر سندرم تخمدان پلی کیستیک در موش آزمایشگاهی بزرگ. پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)، ۷۳، ۱.

2- Ali A, Mostafa M, Hamed W, Mekled A. 2003; Bee venom treatment of refractor pregnancy: A modern trend. *Fertil Steril*. 80(3): 112

3- Ali AFM , Fateen B, Ezzet A, Badawy H, Ramadan A, El-tobge A. 2000; Laparoscopic bilateral intraovarian injection of misoprostol for treatment of polycystic ovarian disease. Endocrinology. 95(4): 15

4- Ali AFM, Mostafa M, Hamed WM, AbdelRahman AE. 2002; Laparoscopic intratubal bee venom in the treatment of proximal tubal obstruction: a new modality. *Fertil Steril*. 78(1):172-173

5- Ali AFM, Mostafa M, Gaafar A, El-Shayeb S, El-Bashir Z. 2003a; Comparative study between bee venom and gonadotrophins for follicular development of immature rats. *Fertil Steril*. 80(3): 259

6- Ali AFM, Mostafa M, Gaafar A, El-shyeb S, El-bashir Z. 2003b; Bee venom promotes *in vivo* follicular development of immature rats. *Fertil Steril*, 80(3): 264-265

7- Armstrong DG, Webb R. 1997; Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod,* 2(3): 139-146

8- Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M, Ishikawa A. 2001; *In viro* growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocyst stage. *J Vet Med Sci.* 63(6): 619-624

9- Chen J, Hudson E, Chi MM, Chang AS, Moley KH, Hardie G, Downs SM. 2006; AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Developmental Biology*. 291: 227-238

10- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiri A. 2002; Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 187:153–159

11- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. 1996; *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Human Reproduction*. 11: 2656-2666

12- Downs SM, Chen J. 2006; Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Mol Reprod Dev*. 73: 1159-1168

13- Downs SM, Hudson ER, Hardie DG. 2002; A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol*. 245: 200-212

Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernsperger N, Stith BJ. 2004; Metformin 14-(Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem Pharmacol.* 67: 2081-2091

15- Hundal RS, Inzucchi SE. 2003; Metformin: new understandings, new uses. *Drugs*. 63: 1879-1894

16- Lee MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2005; The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction.* 73(6): 1264-1268

17- Lord J, Wilkin T. Metformin in polycystic ovary syndrome. 2004; *Curr Opin Obstet Gynecol.* 16: 481-486

18- Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil steril.* 2003, 79(4): 956-962

19- Sekine J, Sakurada T, Oura R. 1992; optimum temperate of ovary transportation for *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Veterinary Records.* 131: 1174-1178

20- Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. 2002; Effects of varying gonadotropin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles *in vitro*. *Hum Reprod.* 17(5): 1181-1188

21- Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R. 1998; Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 338: 1876-880

22- Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y. 1998; Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotropin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Hum Reprod.* 13(3): 664-669

23- Sonntag B, Götte M, Wülfing P, Schüring AN, Kiesel L, Greb RR. 2005; Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. *Ferti Steril.* 84(2): 1173-1179

24- Thibault C. Hammond Memorial Lecture. 1977; Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil.* 51(1): 1-15

25- Velazquez E, Acosta A, Mendoza S. 1997; Menstrual cyclicity after metformin therapy in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 90: 392-395

26- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyket J. 2001; Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167–1174

The effects of metformin and bee venom on in vitro maturation of isolated preantral follicles in mice

Azarnia M., Nabuni M., Kouchesfahani Mohseni H. and Tousu A.

Biology Dept., Biological Science Faculty, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Metformin has multiple benefits in patients with type 2 diabetes. This drug is also used for treatment of patients with Polycystic ovarian syndrome (PCOS), menstruation cycles improvement and ovulation induction. Other studies showed that meformin cause meiotic progression of mice oocytes in *in vitro* condition via activation of Adenosin monophosphate-activated protein kinase (AMPK). Bee venom is a complex compound, consists of enzymes, proteins, peptides and cytokines. Our previous studies have showed the positive effects of bee venom on PCOS and development of ovarian follicles in Wistar rat model. In this study, we focused on the effects of metformin and bee venom both; in development and surviving rate of mouse follicles and their maturation. Ovaries were taken from 14 days old mice. Then mechanically isolated preantral follicles were cultured in α-MEM supplemented with 5% FBS, 100 mIU/ml FSH, 1% insulin-transferrin-selenium under mineral oil for 14 days, and added 10^{-5} M metformin and optimum dose of 1 μg/ml bee venom (based on dosimetric experiments) in treated groups. At day 12 of culture, final oocyte maturation and ovulation was induced by the addition of 1.5 IU/ml hCG and 20 ng/ml (Recombinant epidermal growth factor) rEGF. The *in vitro* effects of metformin and bee venom on mouse preantral follicular growth and subsequent oocyte maturation in all groups were assessed. Our findings showed that diameters of preantral follicles at day2 were increased in metformin group ($P<0.01$), bee venom group ($P<0.05$) and co-culture group ($P<0.05$) significantly. Follicular diameters in day4 also increased in metformin group ($P<0.001$), bee venom group($P<0.05$) and co-culture group ($P<0.01$) significantly. Survival rates in metformin group and co-culture group increased, but this rate decreased in bee venom group, although there were no significant differences among groups. Germinal vesicle (GV) oocytes percentage in metformin group ($P<0.001$), bee venom group ($P<0.01$) and co-culture group decreased ($P<0.01$) significantly. MI and MII oocytes percentage in all treated groups increased but they were not significant. Based of these results, it was shown that follicles treated by metformin and bee venom *in vitro,* grew more significant than control group. In addition ovulated oocytes treated by metformin and bee venom showed much higher meiotic progression, maturation and preparation for fertilization. Based of these data could conclude, metformin and bee venom have developmental effect on competence and maturation of ovarian follicles. Therefore, these data could be useful to improve our knowledge in infertility and menstruation disorders.

Keywords: mouse preantral follicles, metformin, bee venom, *in vitro* maturation(IVM)