

«حضرت محمد صلی الله علیه وآله وسلم»

مومن مانند زنبور عسل است

اگر با او کنار بیایی و همکاری کنی او هم سودمند است

اگر از او اندرزی پرسی، برای تو سودبخش است

اگر در کنار او بنشینی، برای تو سود آور است



این مجموعه را تقدیم می کنم به :

دو وجود مقدس

آنان که ناتوان شدند تا من به توانایی برسم ...

موهایشان سپید شد تا من روسفید شوم ...

عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجودم و روشنگر راهم باشند...

و باسخاوت تمام وبدون هیچ متی از جان و دل در تمامی

مراحل زندگیم، حامی ام بوده اند.

پدر و مادر عزیزم

سپاسگزاری

- جناب آقای دکتر نبیونی

چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزی تو را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه ی محقر وجودم فروزان ساخته است.

آری در مقابل این همه عظمت و شکوه تو مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف.

- سرکار خانم دکتر سیما نصری (رئیس دانشکده)

از زحمات شما استاد فرهیخته و پرتلاش ام بابت تمام محبت ها و پیگیری های بی دریغ تان سپاسگزارم.

- جناب آقای دکتر قانیلی

از تمامی زحمات شما بابت ایجاد هماهنگی بین کار و تحصیل ام سپاسگذارم.

از خواهران دلسوز و مهربانم سپاسگزارم که با عاطفه سرشار شان در لحظه لحظه این پایان نامه مرا همراهی کردند.

از خواهرزاده های عزیزم، افشین و آرش بابت محبت های پراحساس شان ممنون و سپاسگزارم و همچنین از تمامی کسانی که در تدوین این پایان نامه مرایاری رساندند سپاسگزارم از جمله:

آقایان: مهندس رضاوند، مهندس نسیان

خانم ها: کریم زاده، نظری، صفایی، شیخ الاسلام، محمدی، علیرضایی

چکیده

سندرم تخمدان پلی کیستیک نارسایی اندوکرینی است که با هایپراندرورژنیسم، هایپر تکازیسیم و عدم تخمک گذاری همراه است $TNF-\alpha$ در تنظیم فعالیت طبیعی تخمدان در مرحله ی رشد فولیکولی و زرده ای نقش بسزایی دارد و بیان بالای آن در بافت چربی سبب حالتی از چاقی و مقاومت به انسولین در انسان و جوندگان می گردد، چنانچه با تحریک فعالیت میتوتیک سلول های تک بینایی و افزایش تعداد سلول های استروئیدوزنیک سبب پیشبرد سندرم تخمدان پلی کیستیک می گردد. آنتی مولارین هورمون در سلول های گرانولوزای فولیکول های اولیه و آنترال کوچک دیده میشود ولی به تدریج با توسعه فولیکول ها میزان بیان آن کاهش می یابد. این هورمون در مبتلایان به سندرم پلی کیستیک باعث عدم تخمک گذاری می شود. زهر زنبور عسل شامل انواع مختلفی از اجزاء فعال بیولوژیکی با خواص مختلف دارویی است. این مطالعه به منظور تشخیص امکان بهره گیری از زهر زنبور عسل به عنوان یک عامل ضد التهابی و درمانی طراحی شده است. نظر به اثرات ضدالتهابی و ضدسرطانی زهر زنبور عسل بواسطه ی اثر مهاری آن بر بیان $TNF\alpha$ و AMH این بررسی بر این فرضیه استوار گردید که میزان افزایش یافته ی بیان این فاکتور به کمک این زهر تقلیل یابد. بدین منظور 60 سر رت بالغ نژاد ویستار (Wistar) با وزن 170 ± 20 گرم به دو گروه کنترل و گروه پلی کیستیک القا شده با استرادیول ولرات تقسیم گردیدند. به گروه پلی کیستیک $2mg/kg$ استرادیول ولرات بصورت زیر پوستی تزریق شد. پس از 60 روز و تایید پلی کیستیک این گروه به مدت 10 روز متوالی تحت تزریق درون صفاقی $1mg/kg$ زهر قرار گرفتند. سپس به منظور مقایسه ی بافتی و بررسی ایمونولوژیک $TNF\alpha$ با روش ایمنوهیستوشیمی، تخمدان های هر سه گروه برداشت گردیدند. همچنین از سرم رت های سه گروه برای آزمایشات $TNF\alpha$ و آنتی مولارین هورمون به روش الایزا و قند و چربی به روش فتومتریک استفاده شد. داده ها با تست پارامتریک one-way ANOVA آنالیز شدند. نتایج نشان داد که ضخامت لایه ی تکا در گروه تیمار شده با زهر

زنبورافزایش معنا داری نسبت به گروه پلی کیستیک نشان داد. همچنین حضور جسم زرد در گروه سوم نشان از اثرات درمانی زهر زنبور عسل بر این سندرم داشت. نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی افزایش بیان فاکتور $TNF\alpha$ در گروه سندرم پلی کیستیک نسبت به گروه کنترل را نشان داد، در حالی که میزان بیان این فاکتور در نمونه های تیمار شده با HBV کاهش یافت. سطوح قند و چربی خون در گروه $PCOS$ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود در حالی که کاهش آن در گروه تیمار شده با زهر زنبور عسل مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی $TNF\alpha$ و AMH باروش الیزا نشان داد که زهر زنبور عسل باعث کاهش این دو فاکتور می شود و در نتیجه باروری افزایش می یابد. زهر زنبور عسل دارای اثرات مهاری بر بیان $TNF\alpha$ در تخمدان بوده و زهر زنبور عسل سبب کاهش غلاف فولیکولی، کاهش علائم التهاب و تولید جسم زرد می شود و با اعمال تخمک گذاری و تولید جسم زرد سبب بهبود هیستولوژیک تخمدان های پلی کیستیک و سوق آن به سمت تخمدان های سالم و فعال می گردد.

کلمات کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، استرادیول ولرات، زهر زنبور عسل، فاکتور نکروتیک

توموری، آنتی مولارین هورمون

فهرست مندرجات

بخش اول : مقدمه و کلیات

- 2 1-1 ساختار تولید مثلی در پستانداران
- 2 1-1-1 تکوین فولیکولهای تخمدانی
- 3 2-1-1 انواع فولیکولها
- 5 3-1-1 تخمک گذاری
- 6 4-1-1 جسم زرد
- 7 5-1-1 هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH)
- 8 2-1 ناهنجاری های تخمدانی
- 9 1-2-1 انواع ناباروری
- 10 2-2-1 کیست های تخمدانی
- 12 3-2-1 سندرم تخمدان پلی کیستیک
- 13 1-3-2-1 علائم سندرم پلی کیستیک
- 14 2-3-2-1 تشخیص سندرم پلی کیستیک
- 14 3-3-2-1 تغییرات هورمونی در سندرم پلی کیستیک
- 15 4-3-2-1 مکانیسم سلولی در سندرم پلی کیستیک
- 16 5-3-2-1 نقش هورمون ها در سندرم پلی کیستیک
- 17 6-3-2-1 فاکتورهای موثر در سندرم پلی کیستیک

21	3-1 سایتوکاین ها
25	1-3-1 فاکتور نکروتیک توموری آلفا
26	1-1-3-1 ساختار TNF α
28	2-1-3-1 عملکرد TNF α
29	2-3-3-1 ارتباط TNF α و بیماری ها
33	4-1 هورمون آنتی مولارین
35	1-4-1 کاربرد آنتی مولارین هورمون
36	5-1 زهر زنبور عسل
37	1-5-1 چگونگی جمع آوری زهر زنبور عسل
39	2-5-1 خواص ترکیبات زهر زنبور عسل
42	3-5-1 اثرات درمانی زهر زنبور عسل
46	4-5-1 اهداف مطالعه زهر زنبور عسل
	بخش دوم: وسایل، مواد، روش ها
49	1-2: وسایل مورد نیاز
52	2-2: مواد مورد نیاز
54	3-2 طرح کلی
56	4-2 مراحل مقدماتی قبل از القاء سندرم پلی کیستیک
56	1-4-2 سیکل تولید مثل
58	2-4-2 روش تهیه اسمیر واژینال

59	5-2 روش القای سندرم پلی کیستیک
61	6-2 تیمار رت ها
62	7-2 تعیین LD50
62	8-2 نحوه دست یابی به نمونه های مورد آزمایش
65	9-2 روش های مورد بررسی
65	1-9-2 روشهای بررسی مورفولوژی
65	2-9-2 روش هیستوتکنیک
65	1-2-9-2 فیکس کردن نمونه ها
66	2-2-9-2 آگیری نمونه ها
66	3-2-9-2 شفاف سازی
66	4-2-9-2 نفوذ پارافین
67	5-2-9-2 قالب گیری نمونه ها
68	6-2-9-2 برش گیری نمونه ها
68	7-2-9-2 نحوه تهیه چسب هاپت
69	8-2-9-2 نحوه قرار گیری نمونه های برش خورده روی لام
70	9-2-9-2 رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین (H&E)
73	3-9-2 روش ایمنوهیستوشیمی فلورسانس

73	1-3-9-2 روند بازیابی آنتی ژن
74	2-3-9-2 بلوک کردن پروتئین ها
74	3-3-9-2 محلول آنتی بادی اولیه
75	4-3-9-2 محلول آنتی بادی ثانویه
76	4-9-2 سنجش میزان $TNF\alpha$ با الیزا
77	1-4-9-2 بازیابی آنتی ژن
77	2-4-9-2 بلوک کردن پروتئین
78	3-4-9-2 انکوباسیون با آنتی بادی اولیه
78	4-4-9-2 انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه
78	5-4-9-2 ردیابی
79	5-9-2 سنجش آنتی مولارین هورمون با الیزا
79	1-5-9-2 رقیق سازی
80	2-5-9-2 انکوباسیون
81	3-5-9-2 انکوباسیون با معرف A
81	4-5-9-2 انکوباسیون با معرف B
81	5-5-9-2 مرحله بازیابی
81	6-5-9-2 توقف رنگ زایی

82	7-5-9-2 ترسیم منحنی آنتی مولارین هورمون با الیزا
83	6-9-2 روش سنجش میزان قند
83	7-9-2 روش سنجش چربی
83	1-7-9-2 سنجش تری گلیسرید
84	2-7-9-2 HDL سنجش
85	3-7-9-2 LDL سنجش
	بخش سوم : نتایج
87	1-3 نتایج حاصل از بررسی های مورفولوژی
87	1-1-3 بررسی وزن بدن رت ها
88	2-1-3 بررسی های ماکروسکوپی
88	3-1-3 بررسی وزن تخمدان های بدن رت ها
89	2-3 نتایج بررسی های مورفومتریک از طریق هیستوتکنیک
96	3-3 نتایج بیان $TNF\alpha$ از طریق ایمنو هیستوشیمی فلورسنس
98	4-3 نتایج بیان $TNF\alpha$ از طریق الایزا
99	5-3 نتایج آزمایش AMH از طریق الیزا
100	6-3 نتایج سنجش قند
101	7-3 نتایج سنجش چربی ها
102	1-7-3 نتایج سنجش تری گلیسرید

103 HDL 2-7-3 نتایج سنجش

104 LDL 3-7-3 نتایج سنجش

بخش چهارم : بحث و پیشنهادات

106 1-4 سندرم پلی کیستیک

112 2-4 زهر زنبور عسل

114 3-4 چربی ها

116 پیشنهادات

117 بخش پنجم : منابع

فهرست تصاویر

- شکل 1-1: تغییرات تخمدان در یک دوره قاعدگی 4
- شکل 1-2: چرخه تخمک گذاری از ابتدای تا انتها چرخه قاعدگی 5
- شکل 1-3: تغییرات هورمونهای جنسی مترشحه از هیپوفیز در یک دوره قاعدگی 8
- شکل 1-4: فرمول پروستاگلندین 23
- شکل 1-5: مدلی از $TNF \alpha$ 26
- شکل 1-6: مسیر های آپوپتوزی و التهابی فعال شده توسط $TNF \alpha$ 27
- شکل 1-7: فعال سازی رونویسی ژن $COX-2$ از طریق $TNF \alpha$ 29
- شکل 1-8: تغییرات هورمونی در رشد فولیکول ها 34
- شکل 1-9: نمایی از دستگاه تجاری جمع آوری کننده زهر زنبور 37
- شکل 1-10: شکل سه بعدی ملتین 40
- شکل 1-11: مسیر مهاری زهر زنبور عسل بر التهاب 44
- شکل 1-2: نحوه تزریق زیر پوستی استرادیول والرات به رت ها 54
- شکل 2-2: مرحله پرواستروس برگرفته از اسمیر واژینال 56
- شکل 2-3: مرحله دی استروس برگرفته از اسمیر واژینال 57
- شکل 2-4: مرحله مت استروس برگرفته از اسمیر واژینال 57
- شکل 2-5: مرحله استروس برگرفته از اسمیر واژینال 58

- 61 شکل 2-6: تخمدان پلی کیستیک جدا شده از رت القاء شده با استرادیول ولرات
- 62 شکل 2-7: نحوه جراحی رت
- 63 شکل 2-8: نحوه خونگیری از قلب رت
- 64 شکل 2-9: نحوه پیدا کردن تخمدان های رت
- 68 شکل 2-10: نحوه برش گیری با میکروتوم
- 77 شکل 2-11: پلیت کد شده الیزا
- 80 شکل 2-12: نحوه تهیه رقت از استوک استاندارد
- 88 شکل 3-1: چربی های شکمی و تخمدانی در گروه شاهد (PCOS)
- 89 شکل 3-2: تخمدان پلی کیستیک القاء شده با استرادیول ولرات
- 90 شکل 3-3: فتومیکرو گراف تخمدان سالم، پلی کیستیک و تحت تیمار با زهر زنبور
- 91 شکل 3-4: فتومیکروگراف لایه گرانولوزا، لایه تک داخلی و خارجی در تخمدان رت
- 91 شکل 3-5: مقایسه لایه دانه دار و غلاف فولیکولی در فولیکول پری آنترال سالم (A) و فولیکول پری آنترال کیستیک (B)
- 93 شکل 3-6: فتومیکروگراف (b) تخمدان تیمار شده با زهر زنبور عسل
- 93 شکل 3-7: فتومیکروگراف تخمدان بالغ
- 93 شکل 3-8: فتومیکروگراف تخمدان رت
- 94 شکل 3-9: فتومیکروگراف تخمدان طبیعی

- 94 شکل 3-10: فتومیکروگراف تخمدان پلی کیستیک
- 94 شکل 3-11: فتومیکروگراف تخمدان پلی کیستیک
- 95 شکل 3-12: فتومیکروگراف تخمدان طبیعی
- 95 شکل 3-13: فتومیکروگراف تخمدان پلی کیستیک
- 95 شکل 3-14: فتومیکروگراف تخمدان تیمار شده با زهر .
- 96 شکل 3-15 : راه اندازی مسیرهای التهابی توسط $TNF\alpha$
- شکل 3-16 : مقایسه میزان بیان $TNF\alpha$ در گروه‌های کنترل و مبتلا به PCOS و تیمار شده با
- 97 HBV به روش ایمونوهیستوشیمی.

فهرست نمودارها

- نمودار 3-1: تغییرات وزن بدن در گروه‌های کنترل، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 87
- نمودار 3-2: تغییرات وزن تخمدان در گروه‌های کنترل، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 89
- نمودار 3-3: تغییرات ضخامت لایه تکای فولیکول‌های آنترال در گروه‌های کنترل، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 92
- نمودار 3-4: تغییرات میزان بیان $TNF\alpha$ از طریق الایزا در گروه‌های کنترل، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 98
- نمودار 3-5: تغییرات میزان AMH از طریق الایزا در گروه‌های کنترل، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 99
- نمودار 3-6: تفاوت سطح قند خون در گروه‌های کنترل، شم، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 100
- نمودار 3-7: تفاوت سطح تری گلیسرید در گروه‌های کنترل، شم، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 103
- نمودار 3-8: تفاوت سطح HDL در گروه‌های کنترل، شم، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 103
- نمودار 3-9: تفاوت سطح LDL در گروه‌های کنترل، شم، مبتلا به PCOS و تیمار شده با HBV. 104

فهرست جداول و منحنی ها

-
- 38 جدول 1-1: ترکیبات موجود در زهر زنبور عسل
- 45 جدول 2-1: خواص درمانی و بیولوژی ترکیبات مختلف زهر زنبور عسل
- 49 جدول 1-2: وسایل مورد نیاز
- 52 جدول 2-2: مواد مورد نیاز
- 76 منحنی 1-2: منحنی برادفورد غلظت پروتئین
- 82 منحنی 2-2: ارتباط بین غلظت و جذب نوری آنتی مولارین هورمون
- 84 فرمول 1-2: محاسبه HDL (چربی خوب)
- 85 فرمول 2-2: محاسبه LDL (چربی بد)

بخش اول

مقدمه و کلیات

1-1 ساختار تولید مثلی در پستانداران

دستگاه تناسلی ماده از یک زوج عنصر اصلی به نام تخمدان و مجاری تناسلی به نامهای مجرای زهدانی، زهدان، مهبل و بخش خارجی دستگاه تناسلی ماده تشکیل شده است. تخمدانها دو عضو بیضی شکل هستند که در دو طرف رحم، در زیر لوله و در دیواره طرفی لگن قرار دارد. تخمدان از دو ناحیه محیطی و مرکزی تشکیل شده است که سطح تخمدان بوسیله تعدادی سلولهای پوششی به نام اپتلیوم زایا پوشیده شده است و در ناحیه محیطی تعدادی فولیکول قرار دارد و در داخل هر فولیکول یک سلول جنسی ماده یا تخمک قرار دارد و در بخش مرکزی رگها و اعصاب تخمدان قرار دارد. تخمدانها با تولید هورمونهای استروئیدی و پپتیدی در کنترل چرخه تولید مثلی نقش دارد. استروژن و پروژسترون دو هورمون مهم تولید شده از تخمدان هستند که از فولیکولها و جسم زرد تولید شده و بر تخمک گذاری تاثیر می گذارند، البته ترشح هر دو این هورمونها تحت کنترل هورمونهای هیپوفیزی FSH، LH میباشد (1).

1-1-1 تکوین فولیکولهای تخمدانی

در قشر تخمدان تعداد بسیار زیادی فولیکول اولیه وجود دارد که تعداد این فولیکولها با افزایش سن کم می شود بنابراین، در دوران جنینی بیشترین تعداد و در زمان منوپاز کمترین تعداد وجود دارد. در زمان بلوغ تحت تاثیر هورمون هیپوفیز بخصوص FSH تخمدان فعال شده و فولیکول های اولیه شروع به رشد میکنند. وقتی یکی از فولیکولهای اولیه رشد بیشتری می کند تقسیم میتوز کرده و یک سلول $2n$ کروموزومی به نام اووسیت اولیه را ایجاد میکند و اووسیت اولیه هم بعد از تقسیم میوز به

یک سلول n کروموزومی به نام اووسیت ثانویه و جسم قطبی تولید می کند. تحت اثر هورمون FSH تخمک ساخته می شود و تعداد زیادی سلول در اطراف تخمک بوجود می آید که به آن سلولهای گرانولوز و به مجموعه فولیکول گراف گویند. به تدریج در کنار سلولهای گرانولوز حفره و فضایی بوجود می آید که به فضای ایجاد شده در داخل فولیکول گراف فضای آنتروم گویند. یکسری از سلولهای گرانولوز که دور تخمک را گرفته اند در داخل سلولهای تک داخلی و در خارج سلولهای تک خارجی را میسازند. کار سلولهای تک داخلی ترشح هورمون استروژن تحت تاثیر هورمون FSH است و کار سلولهای تک خارجی ترشح هورمون پروژسترون است. بعد از آزاد شدن تخمک سلولهای تک داخلی و تک خارجی جسم زرد را تشکیل می دهد. در صورتی که لقاح صورت گیرد در بعضی مواقع باروری در بخش میانی یا آمپول لوله زهدان صورت میگیرد و همانطور که در شکل 1-1 نشان داده شده است، فولیکول پاره شده پس از تغییراتی به جسم زرد تبدیل میشود ولی اگر باروری صورت نگیرد جسم زرد به تدریج تحلیل می رود و جسم سفید بوجود می آید (2).

2-1-1 انواع فولیکولها

الف: فولیکول اولیه یا بدوی

فولیکول های اولیه یا بدوی با قطر 17 تا 20 میکرومتر در زیر سفید پرده تخمدان (پرده ای از بافت همبند با رشته های کلاژن زیر اپتلیوم ژرمینال) قرار دارند و در وسط هر فولیکول اولیه یک اووسیت با سیتوپلاسم و هسته واضح با قطر 11 تا 15 میکرومتر وجود دارد و اطراف اووسیت را یک لایه سلول دوکی شکل احاطه کرده است (2).

ب: فولیکولهای ثانویه یا پره آنترال

در این فولیکول ها اووسیت بزرگ در وسط و سیتوپلاسم واضح و قرمز رنگ با هستک های بنفش متعدد است و یک ناحیه شفاف بارنگ قرمز به نام زونا پلوسیدا در اطراف غشای سیتوپلاسمی

اووسیت قرار دارد . در خارج ناحیه زونا پلوسیدا، سلولهای گرانولوزا یا فولیکولار قرار دارد که به سرعت تکثیر شده و به تدریج لایه های تک داخلی و تک خارجی ساخته میشود(2).

1-Tunica Albuginea

ج: فولیکولهای آنترال

در این مرحله لایه تکای داخلی تکثیر پیدا کرده و آنتروم را گسترده میکند و در این مرحله حفره آنتروم از مایع فولیکولی پر میشود و در لایه تکای خارجی هم رگ زایی زیاد میشود. همچنین سلولهای گرانولوزا در این مرحله تکثیر بیشتری پیدا می کنند و رشد سلولهای گرانولوزا به سمت هم باعث تشکیل توده تخمکی کومولوس میشود که شامل سلولهای دانه دار است و بقیه سلولهای گرانولوزا تشکیل دیواره را می دهند، ترکیب اووسیت با کومولوس باعث ایجاد ناحیه ضخیم به سمت آنتروم میشود و سلولهای گرانولوزای دیواره ای و سلولهای تک تشکیل جسم زرد را میدهند(2).

د: فولیکولهای کیستیک

این فولیکول ها بصورت کیسه پراز مایع اند که در اثر فساد درونی فولیکولهای تخمدانی ایجاد می شوند

ه : فولیکولهای پاره شده و هموراژیک : به دلیل وجود خون در این فولیکول ها به جسم هموراژیک مشهور اند که پس از دفع اووسیت ها از داخل فولیکول ها این حالت دیده میشود(3).

