

بررسی اثر کورکومین بر بافت تخمدان موش سوری در شرایط برون تنی

محسن حسینی^۱، فرهاد محمدی قشلاق^۲، زهرا خداپرست^۲، علی محمدعینی^{۲*}

۱. کارشناس ارشد بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات، واحد تهران، تهران، ایران

۲. دکتری تخصص بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۵)

چکیده

استفاده از آنتی اکسیدان‌ها به عنوان یک روش شناخته شده برای افزایش تعداد فولیکول‌ها و تخمک گذاری در حیوانات وانسان می‌باشد. ماده موثره زرد چوبه کورکومین (Curcumin) موجب مهار لیپوکسیژناز، سیکلوکسیژناز می‌باشد. لذا در این مطالعه ما به بررسی اثرات غلظت‌های مختلف کورکومین بر کشت بافت تخمدان موش سوری نژاد NMRI پرداخته ایم.

در این مطالعه تعداد ۴۰ جفت تخمدان از موش ماده ۵ هفته ای پس از تشخیص فاز سیکل جنسی (استروس) به ظروف مخصوص کشت اندام، منتقل شد. گروه‌های مورد مطالعه با غلظت‌های مختلف کورکومین (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر تیمار و مورد بررسی قرار گرفتند. تخمدان‌ها بمدت ۶ روز در محیط کشت شدند و از نظر تعداد فولیکول‌های و اندازه لایه‌های تکا و گرانولوزا مورد بررسی قرار گرفتند و با نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ با تست ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در مقایسه تعداد فولیکول‌های اولیه تک لایه بین گروه کنترل (۱۵/۷±۳/۲) و در گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ نانوگرم در میلی لیتر کورکومین بترتیب (۳۱/۰±۵/۳۳، ۰/۳±۵/۹) بود که افزایش معنی داری را در تمام گروه‌های تیمار نسبت به کنترل نشان داد (P<0.05). در تعداد فولیکول‌های بالغ گروه کنترل کشت شده (۴۰±۴/۰) نسبت به گروه تیمار با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (۴۸/۵±۳/۲) نیز افزایش معنی داری در تعداد فولیکول‌های بالغ داشته است. (P<0.05)

نتیجه‌گیری کلی: با توجه به نتایج به دست آمده بر تعداد و کیفیت فولیکول‌های بدست آمده به نظر میرسد این روش در تولید حفظ و تکوین فولیکول‌های تخمدانی در محیط کشت موثر و کارآمد می‌باشد.

کلیدواژگان

بافت تخمدان، کشت بافت، کورکومین، موش سوری.



مقدمه

تخمدان دست نخورده موش تازه متولد شده، که تنها شامل فولیکول‌های پریموردیال است را می‌توان به مدت ۸ روز کشت داد و تولید فولیکول‌های پره آنترال با دو لایه سلول‌های گرانولوزا کرد، اووسیت حاصل از آن نیز به طور معمول در محیط کشت آزمایشگاهی، رشد می‌کند (۸، ۱۱). رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان شامل یک سری از مراحل تنظیمی رشد و تمایز سلول‌های فولیکولی است (۴). یکی از شاخص‌های شناخته شده فولیکول آنترال سالم، ظرفیت استروئیدسازی سلول‌های گرانولوزای آن است (۲). در نشخوارکنندگان و انسان، سلول‌های گرانولوزا آندروژن مشتق شده از سلول‌های تکا را با آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز (Cyp19) به استروژن تبدیل می‌کنند. بیان mRNA ی Cyp19 توسط تحریک هورمون محرک فولیکول (FSH) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در موش، انسان و نشخوارکنندگان تنظیم و انجام می‌شود (۸). نتایج در شرایط برون تنی (In vitro) سریعتر از شرایط درون تنی (In vivo) به دست می‌آیند و نیز از نظر کمی آسانتر مطالعه می‌شود. در داخل بدن تفسیر نتایج بدلیل وجود فاکتورهای شیمیایی مختلف پیچیده‌تر و مشکل‌تر است (۱۱). مطالعات دارویی گاهی نتایج متناقضی در شرایط برون و درون تنی می‌دهد چون بعضی داروها در بدن متابولیزه می‌شود (۸). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک روش شناخته شده برای افزایش تعداد فولیکول‌ها و تخمک گذاری در حیوانات و انسان می‌باشد. تخمدان دست نخورده موش تازه متولد شده، که تنها شامل فولیکول‌های پریموردیال است را می‌توان به مدت ۸ روز کشت داد و تولید فولیکول‌های پره آنترال با دو لایه سلول‌های گرانولوزا کرد، اووسیت حاصل از آن نیز به طور معمول در محیط کشت آزمایشگاهی، رشد می‌کند (۵).

کورکومین (Curcumin) ماده موثره زردچوبه، اثرات ضد تکثیر سلولی، مهار لیپوکسیژناز، سیکلوکسیژناز و ماتریکس متالوپروتئیناز و NF-κB و کاهش تولید سایتوکاین‌های التهاب زا مانند عامل نکروز تومور آلفا و اینترلوکین-۱۰، کاهش سینتاز اکسید نیتریک قابل القا و کاهش تولید آنزیم‌های تخریب کننده مفصل شامل کلاژناز، الاستازو هیالورونیداز می‌باشد (۱۳)، همچنین موجب مهار سیکلوکسیژناز میشود (۱۵). کورکومین تجاری شامل سه جزء اصلی می‌باشد: دی فرولول متان (۸۲ درصد)، دی متوکسی کورکومین (۱۵ درصد)، بیس دی متوکسی کورکومین (۳ درصد) میباشد که با هم به عنوان کورکومینوئید می‌باشند (۱). در واکنش فنتون (تولید رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل) رادیکال‌های هیدروکسیل آزاد شده توسط عصاره کورکومین حذف می‌شوند. عصاره کورکومین توانایی مهار تجزیه ۲-دزوکسی D- ریبوز تولید شده توسط رادیکال‌های هیدروکسیل را دارد (۱۸). کورکومین محافظت بالایی در مقابل رادیکال‌های آزاد ROS دارد که به خاطر کتون‌ها و آلدئیدهای مونوترپن (سیترال‌ها سیترونیل‌ایزومنتون و منتون) موجود در آن است (۱۳). مطالعات متعدد مربوط به کشت آزمایشگاهی فولیکول‌های پره آنترال نشان‌دهنده نقش آنتی‌اکسیدانت‌ها در تنظیم رشد و نمو فولیکول‌ها است (۵).

با توجه به اهمیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در سیستم‌های کشت فولیکول در شرایط *in vitro*، در این مطالعه اثرات مختلف غلظت کورکومین، بر کشت آزمایشگاهی بافت تخمدان و بررسی تکوین فولیکول‌ها مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه از تخمدان‌های ۴۰ سر موش ماده ۵ هفته ای در پنج گروه هشت تایی استفاده گردید.



۶ روز به محیط کشت پایه ۸ تخمدان از موش‌ها افزوده می‌شود.

گروه ۴: که مقدار 40 ng/ml کورکومین، به مدت ۶ روز به محیط کشت پایه ۸ تخمدان از موش‌ها افزوده می‌شود. گروه ۵: که مقدار 80 ng/ml کورکومین، به مدت ۶ روز به محیط کشت پایه ۸ تخمدان از موش‌ها افزوده می‌شود.

در پایان روز ششم ارزیابی میکروسکوپی سلول‌های تکا، گرانولوزا و شمارش فولیکول‌های سالم و آسیب دیده تخمدان، تحت رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد. اطلاعات با نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار ANOVA برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد و $P < 0/05$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

تعداد فولیکول‌های اولیه یک لایه گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۱۰،۲۰،۴۰ نانوگرم در میلی لیتر کورکومین افزایش معنی داری را در تمام گروه‌های تیمار نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۱ (شکل ۲)).

تعداد فولیکول‌های اولیه چند لایه گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر کورکومین در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). همچنین گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۴۰ و ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها نیز کاهش معنی داری را نشان می‌دهد (جدول ۱) (شکل ۳).

تفاوت در فولیکول‌های ثانویه تخمدان‌های کشت شده گروه کنترل با گروه‌های تحت تیمار با غلظت ۴۰،۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر نیز معنی دار بوده و کاهش معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$) (جدول ۱) (شکل ۴). در دیگر گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنی داری مشاهده نگردید.

قبل از کشتار از همه موش‌ها اسمیر واژن تهیه و با میکروسکوپ نوری بررسی شد بدین منظور که دوره استروس حیوان تشخیص داده شود (تمامی نمونه برداری‌ها در این مرحله انجام شد). در فاز استروس، سلول‌های اپی تلیال هسته دار همراه با سلول‌های اپی تلیال شاخی شده بدون هسته، قابل رؤیت بود.

در مرحله متاستروس، سلول‌های شاخی فراوان همراه با سلول‌های هسته دار و لکوسیت و در مرحله دیاستروس، لکوسیت فراوان همراه با سلول‌های اپی تلیال هسته دار دیده می‌شود.

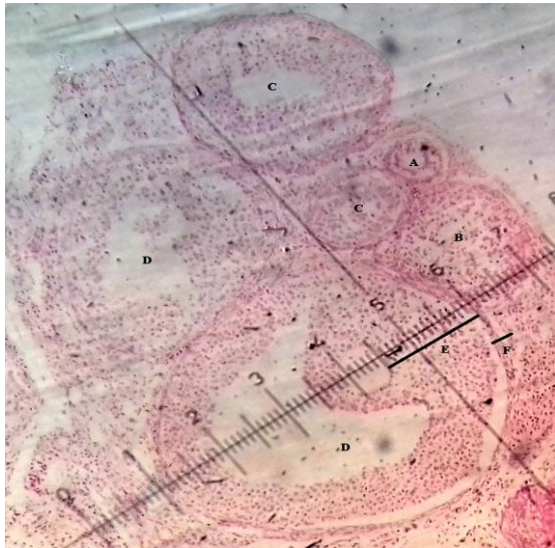
پس از جدا کردن چربی اطراف تخمدان‌ها و ۲ بار شستشو در محلول نمکی بالانس شده هنکس (HBSS) یکی از تخمدان‌ها به ظروف مخصوص کشت اندام، منتقل و یکی دیگر جهت بررسی نمونه کنترل در محلول بوئن فیکس شد. در فاز بین محیط کشت مایع حاوی (DMEM، FBS ۱۰٪، BSA mg/ml ۱.۳٪، پنی سیلین - استرپتو مایسین) و هوا، درون انکوباتور CO2 دار ۵٪ و ۹۵٪ هوا در دمای 37 ± 1 درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز انکوبه شد. محیط کشت در هر روز یکبار تعویض گردید.

گروه ۱ به عنوان گروه کنترل هیچ نوع مواد افزودنی (کورکومین) ندارند و محیط کشت بافت تخمدان تنها حاوی محیط کشت پایه (DMEM)، FBS ۱۰٪، پنی سیلین - استرپتو مایسین ۱٪، همراه ۳ mg/ml BSA خواهد بود. فقط بافت تخمدان کشت داده شده سایر گروه‌ها با این گروه مقایسه می‌شوند. گروه ۲: که مقدار 10 ng/ml کورکومین به مدت ۶ روز به محیط کشت پایه تخمدان موش‌های ۵ هفته ای سوری نژاد NMRI افزوده می‌شود و بافت تخمدان را از لحاظ بافت شناسی مورد بررسی قرار می‌دهیم. محیط‌های کشت هر دو روز یکبار تعویض خواهند شد.

گروه ۳: که مقدار 20 ng/ml کورکومین، به مدت



فولیکول‌های دوگراف (بالغ) در تخمدان‌های کشت شده در گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کورکومین در محیط کشت تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۱) (شکل ۷).



شکل ۱- فولیکول‌های اولیه، ثانویه و بالغ در تخمدان کشت داده شده تحت تیمار (بزرگنمایی ۱۰۰X با رنگ آمیزی H&E). A: فولیکول اولیه چند لایه. B: فولیکول آترزی شده. C: فولیکول ثانویه. D: فولیکول بالغ همراه با کومولوس اووفروس. E: لایه گرانولوزا. F: لایه تک داخلی و خارجی.

در مقایسه تعداد فولیکول‌های بالغ گروه کنترل نسبت به گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کورکومین مشخص گردید که در گروه تیمار با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر به نسبت گروه کنترل و دیگر گروه‌های تیمار افزایش معنی داری در تعداد فولیکول‌های بالغ داشته است. ($P < 0.05$). همچنین در گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۲۰،۴۰ نانوگرم بر میلی لیتر تعداد فولیکول‌های بالغ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می‌دهند ($P < 0.05$). (جدول ۱) (شکل ۵).

با توجه به اینکه لایه‌های تک داخلی و تک خارجی از یکدیگر بخوبی قابل تمیز نبودند لذا اندازه لایه تک داخلی و خارجی با یکدیگر محاسبه گردیده است. با بررسی گروه‌های مورد مطالعه مشخص گردید که اندازه لایه ی تکا در گروه تیمار با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داده است ($P < 0.05$). در حالی که در مقایسه با گروه‌های دیگر تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۱) (شکل ۶).

همچنین در مقایسه اندازه لایه گرانولوزای

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار داده‌های مربوط به گروه کنترل و گروه‌های مورد مطالعه تحت تیمار

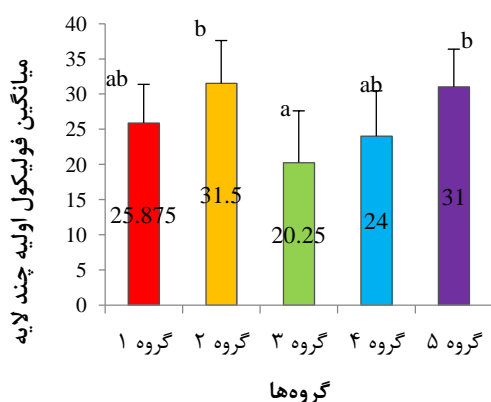
ANOVA	Levene	انحراف معیار	میانگین	گروه‌ها	صفت
۰/۰۰۰	۰/۴۶۴	۳/۲۸۴	۱۵/۷۵	گروه کنترل	فولیکول اولیه تک لایه
		۶/۲۳۳	۳۵/۵	گروه غلظت 10ng/ml	
		۴/۲۴۲	۳۱/۵	گروه غلظت 20ng/ml	
		۵/۰۹۹	۳۱	گروه غلظت ۲۰ ng/ml	
		۵/۹۹۸	۳۳/۳۷	گروه غلظت ۰۸ ng/ml	
۰/۰۰۴	۰/۸۱۹	۵/۴۸۸	۲۵/۸۷	گروه کنترل	فولیکول اولیه چند لایه
		۶/۰۹۴	۳۱/۵	گروه غلظت 10ng/ml	
		۷/۳۴۳	۲۰/۲۵	گروه غلظت 20ng/ml	
		۶/۴۳۶	۲۴	گروه غلظت ۲۰ ng/ml	
		۵/۳۷۱	۳۱	گروه غلظت ۰۸ ng/ml	
۰/۰۰۰	۰/۰۲۱	۵/۳۸۳	۱۹/۱۲	گروه کنترل	فولیکول ثانویه
		۲/۸۷۸	۲۱/۵	گروه غلظت 10ng/ml	



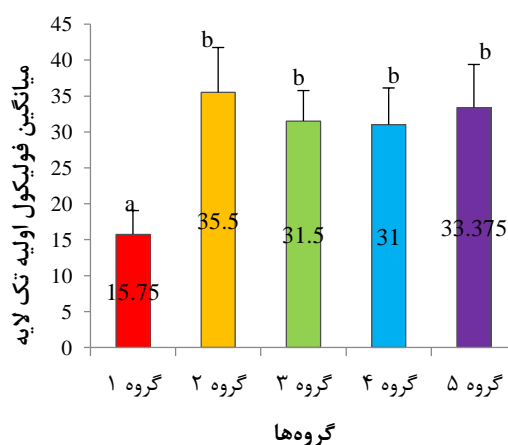
ANOVA	Levene	انحراف معیار	میانگین	گروه‌ها	صفت
		۳/۴۵۳	۱۴/۷۵	گروه غلظت 20ng/ml	
		۲/۴۴۵	۵/۶۲	گروه غلظت ۲۰ng/ml	
		۱/۴۵	۱۱۶/۱۲	گروه غلظت ۰.۸ng/ml	
. / .۰۰۰	. / .۶۳	۴/۰۷۰	۴۰	گروه کنترل	فولیکول بالغ
		۳/۲۹۵	۴۸/۵	گروه غلظت 10ng/ml	
		۴/۱۴۰	۲۲	گروه غلظت 20ng/ml	
		۵/۶۴۲	۱۵/۸۷	گروه غلظت ۲۰ng/ml	
		۶/۰۹۰	۳۶/۶۲	گروه غلظت ۰.۸ng/ml	
. / .۰۰۰	. / .۰۰۰	۲/۳۱۴	۲۵	گروه کنترل	لایه نکا
		۱/۷۶۷	۳۷/۲۴	گروه غلظت 10ng/ml	
		۵	۲۵/۲۱	گروه غلظت 20ng/ml	
		۷۱۲/۴	۳۱/۲۰	گروه غلظت ۲۰ng/ml	
		۲۱۶/۲	۶۲/۳۰	گروه غلظت ۰.۸ng/ml	
۶۸۵ .۰	.۰۰۲ / .۰	۰.۸۶/۲	۸۱/۴۷	گروه کنترل	لایه گرانولوزا
		۰.۸۶/۲	۸۱/۴۷	گروه غلظت 10ng/ml	
		۵.۰۹/۵	۲۵/۴۶	گروه غلظت 20ng/ml	
		۴۱۹/۴	۹۳/۴۵	گروه غلظت ۲۰ng/ml	
		۰.۸۶/۲	۸۱/۴۷	گروه غلظت ۰.۸ng/ml	

سطح اختلاف معنی داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

حداقل بین دو گروه می‌تواند اختلاف معناداری باشد که برای مشخص شدن آن از آزمون توکی استفاده شد و مشخص شد که بین گروه ۱ با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد.



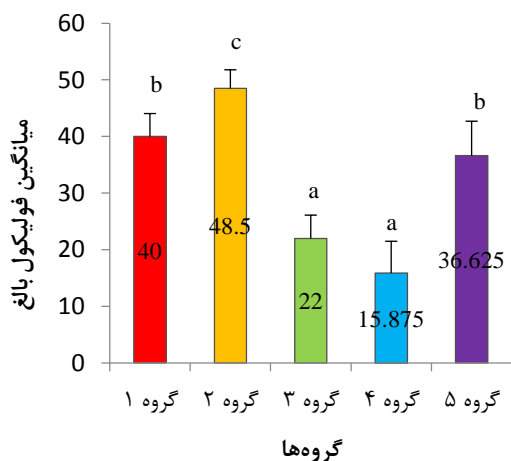
شکل ۳- مقایسه میانگین فولیکول‌های اولیه چند لایه گروه کنترل و تیمار



شکل ۲- مقایسه میانگین فولیکول‌های اولیه یک لایه گروه کنترل و تیمار

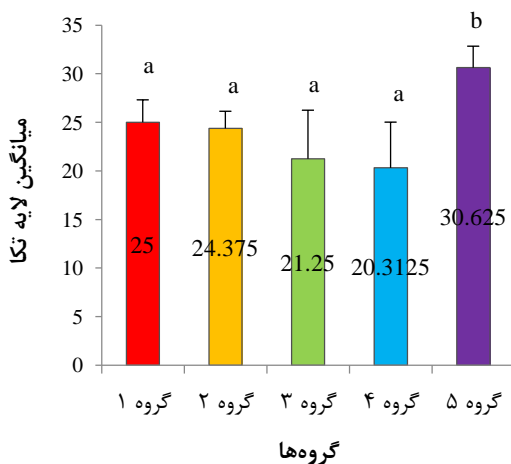
از لحاظ میانگین فولیکول تک لایه آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر می‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که





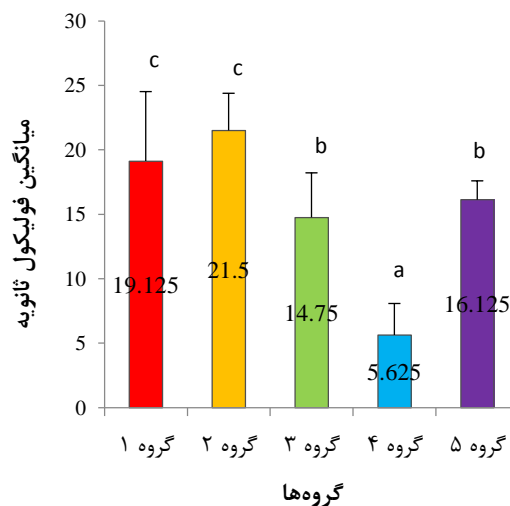
شکل ۵- مقایسه میانگین فولیکول‌های بالغ گروه کنترل و تیمار

از لحاظ میانگین فولیکول بالغ آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر می‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که حداقل بین دو گروه می‌تواند اختلاف معناداری باشد که برای مشخص شدن آن از آزمون توکی استفاده شد و مشخص شد که بین گروه ۳ و ۴ اختلاف معناداری وجود ندارد ولی با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد، گروه ۱ و ۵ با هم اختلاف معناداری ندارند ولی با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری دارند و گروه ۲ با تمامی گروه‌ها اختلاف معناداری دارد.



شکل ۶- مقایسه میانگین لایه‌های تک داخلی و خارجی گروه کنترل و تیمار

از لحاظ میانگین فولیکول اولیه چند لایه آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر می‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که حداقل بین دو گروه می‌تواند اختلاف معناداری باشد که برای مشخص شدن آن از آزمون توکی استفاده شد و مشخص شد که بین گروه ۳ و ۴ اختلاف معناداری وجود ندارد ولی گروه ۳ با گروه‌های ۱، ۲، ۴ و ۵ اختلاف معناداری وجود ندارد.



شکل ۷- مقایسه میانگین فولیکول‌های ثانویه گروه کنترل و تیمار

از لحاظ میانگین فولیکول ثانویه آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر نمی‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که حداقل بین دو گروه می‌تواند اختلاف معناداری باشد که برای مشخص شدن آن از آزمون دانت استفاده شد و مشخص شد که بین گروه ۱ با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد، گروه ۳ و ۴ با هم اختلافی ندارند ولی با گروه‌های ۱ و ۲ اختلاف معناداری دارند و گروه‌های ۱ و ۲ نیز اختلاف معناداری با هم ندارند.

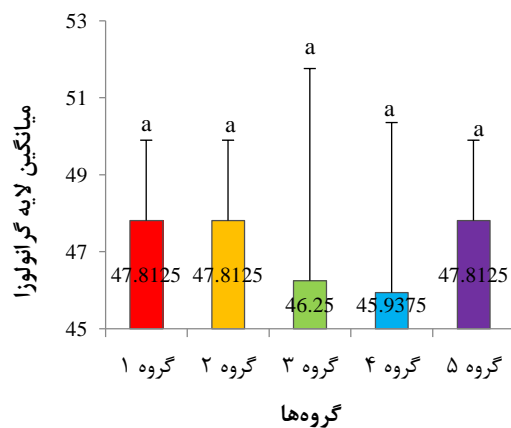


در پژوهش مروری ژو و همکاران (۲۰۰۹)، مشخص شد که کورکومین خاصیت ضد التهابی دارد و مطالعات بالینی که بر روی کشت سلولی و حیوانات انجام شده نیز حاکی از آن است که کورکومین بروی بیماری‌هایی مانند آرتريت موثر می‌باشد و قادر به برقراری ارتباط با اهداف مولکولی متعدد درگیر در التهاب است (۱۶). خاصیت ضد التهابی بر اثر آزاد سازی برخی فاکتورهای ضد التهابی می‌باشد که ممکن است در پژوهش حاضر نیز این امر موجب تاثیر عدم آپوپتوز در اثر فاکتورهای التهابی بر روی بافت تخمدان باشد.

تخمدان دارای گیرنده‌های انسولین است که نقش این پپتید را در تنظیم تخمدان نشان می‌دهد. مطالعات *in vitro* نشان داده اند که انسولین می‌تواند به طور مستقیم سبب تحریک تولید آندروژن توسط استرومای تخمدان شود (۵۲-۲۱). علاوه بر این، یک سیستم کشت تخمدان خوب که می‌تواند شرایط تخمدان را تقلید کند، جهت مطالعه اووژنز و فولیکولوژنز نقش محوری و اساسی دارد و عرضه نامحدودی را برای استفاده پزشکی از اووسیت ارائه می‌کند (۲۶). از بیش از ۲۰ سال گذشته اووژنز موش با استفاده از تکنولوژی کشت آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. تخمک‌های اولیه در فولیکول‌های پریموردیال تخمدان موش تازه متولد شده قادر به وارد شدن به دومین تقسیم میوز و بلوغ کامل میوزی در شرایط *in vitro* می‌باشند. اووژنز موش در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از کشت در شرایط *in vitro* اخیرا در چندین آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰-۱۸).

در پژوهش دیگری کیان بخت، دریافتند که کورکومین (Curcumin) ماده موثره زردچوبه، اثرات ضد تکثیر سلولی (۷-۹)، مهار لیپوکسیژناز، سیکلوکسیژناز و ماتریکس متالوپروتئیناز و کاهش تولید آنزیم‌های تخریب کننده مفصل شامل کلاژناز،

از لحاظ میانگین فولیکول لایه تکا آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر می‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که حداقل بین دو گروه می‌تواند اختلاف معناداری باشد که برای مشخص شدن آن از آزمون توکی استفاده شد و مشخص شد که بین گروه ۵ با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد.



شکل ۷- مقایسه میانگین لایه‌های گرانولوزا گروه کنترل و تیمار

از لحاظ میانگین فولیکول لایه گرانولوزا آزمون لون مشخص می‌کند که واریانس گروه‌ها با هم برابر نمی‌باشند و آزمون ANOVA مشخص می‌کند که بین دو گروه نمی‌تواند اختلاف معناداری باشد.

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر اثرات مختلف کورکومین بر کشت آزمایشگاهی بافت تخمدان مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به نتایج بدست آمده و بررسی‌های هیستولوژیکی بافت‌های تخمدان کشت داده شده تحت تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۴۰، ۲۰، ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر با کورکومین افزایش تعداد فولیکول‌های اولیه تک لایه، چندلایه، فولیکول‌های ثانویه و فولیکول‌های بالغ وابسته به دوز مشاهده گردید که حاکی از اثر بخشی این ماده در محیط کشت و تکوین فولیکول‌ها بوده است.



موراویوا و همکاران تأثیر منوترپنوبید فروتنین را که فیتواستروژنی قوی محسوب می‌شود و از ریشه گیاهان جنس فرولا استخراج شده است را بر میزان تکثیر رده سلول‌های شبه استئوبلاستی MC3T3-E 1 در بازه‌های غلظتی ۱۰-۶ و در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصاره بررسی کردند. با توجه به نتایج فروتنین، در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از تیمار در پایین‌ترین غلظت به کار رفته ۱۰-۶ دارای بیشترین تأثیر تکثیری بر رده سلول‌های شبه استئوبلاستی بود و به تدریج و با افزایش غلظت عصاره از شدت تکثیر سلول‌ها کاسته شد. ه است و نتایج پژوهش مارینا و همکاران (۲۰۱۲)، نیز با این مشابه است (۱۷).

با توجه به آنکه زردچوبه در طب سنتی در بیماری‌های متعدد تجویز می‌شود، به نظر می‌رسد که انجام تحقیقات بالینی بیشتری روی این ماده و ریزوم آن در آینده قدرت رشد و انعطاف پذیری و تکوین سلول‌ها و اندام‌های تحت تأثیر کورکومین، قدرت پیوند و بقای آن‌ها در محیط بدن مورد بررسی قرارگیرد.

الاستازو هیالورونیداز را دارد. که اثرات آنتی اکسیدانی این ماده در مطالعه ما نیز در تکوین فولیکول‌ها کاملاً مشهود بوده است (۳). همچنین مون و همکاران در پژوهشی دریافتند که کورکومین در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، موجب کاهش سلول‌های کندروسیتی پس از ۲۴ ساعت می‌شود (۱۲).

در پژوهش دیگری ابیکال و همکاران دریافتند که کورکومین در سلول‌های کندروسیتی گاو در غلظت‌های بالای ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث افزایش مرگ سلولی می‌شود. البته در اکثر مطالعات انجام شده کورکومین سمیتی در انسان نداشته است، ولی در دو مطالعه دیگر نتیجه برعکس گزارش شده است (۱۷).

در تحقیقی که ژو و همکاران انجام دادند سمیت و همچنین میزان تکثیر سلولی در حضور ماده رسوراتول که از گیاهان استخراج می‌شود بر رده سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسانی بررسی کردند، ماده رسوراتول در غلظت‌های پایین یعنی ۰/۱ میکرومولار دارای اثرات تحریکی و با افزایش غلظت در ۱۰ میکرومولار اثر ممانعت‌کننده از تکثیر سلولی داشت (۱۴)، در مطالعه دیگری



منابع و مأخذ

1. Abigail L, Clutterbuck C, Allaway D, Harris P, Curcumin reduces prostaglandin E2, matrix metalloproteinase-3, F1000Research 2013, 2:147.
2. Acautam SC, Gao X, Dulchavsky S. Immunomodulation by curcumin. *Adv. Exp. Med Biol.* 2007; 595: 321 – 41.
3. Akra M., Shahab-Uddin, Afzal Ahmed, Khan Usmanghani, Abdul hannan, E. mohiuddin, M. Asif, Curcumin Longa and Curcumin: A Reviwe article , rom. J. BIOL. – PLANT biol., 2010; 55 (2):65–70
4. Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 92:39-43.
5. Blandau, R. J., E. Warrick, and R. E. Rumery: In vitro cultivation of fetal mouse ovaries. *Fert Steril*(1965) 16, 705-715.
6. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 88:511-22.
7. Devine, P., K. Rajapaksa, et al. "In vitro ovarian tissue and organ culture: a review. " *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* (2002) 7: d1979-89.
8. Eppig, J. J. and M. J. O'Brien. "Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. " *Biology of Reproduction*(1996) 54(1): 197-207.
9. Fainstat, T. : Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. *Fert Steril* (1968)19, 317-338.
10. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica.* 1978; 8:761–768.
11. Hennet, M. L. and C. Combelles (2010)"The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. " *The International journal of developmental biology* (2012) 56(3): 819-831.
12. Henrotin, A. L. Clutterbuck, D. Allaway, E. M. Ludwig, P. Harris, M. Mathy-Harterty, M. Shakibaeik and A. Mobasher, Biological actions of curcumin on articular chondrocytes, Osteoarthritis and Cartilage , 2010; 18, 141-149.
13. Unnikrishnan MK, Rao MN. Curcumin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation. *FEBS Lett.* 1992; 301: 195–196.
14. Jin, S. Y., L. Lei, et al. "A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. " *Fertility and sterility*(2010) 93(8): 2633-2639.
15. Jiang J, Wang W, Sun YJ, Hu M, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemic rats by preventing blood-brain barrier damage. *Eur J Pharmacol.* 2007; 561: 54–62.
16. Marina Klawitter, Lilian Quero, Juergen Klasen, Alexia N Gloess, Babette Klopprogge, Oliver Hausmann, Norbert Boos^{1,2,5} and Karin Wuertz, Curcuma DMSO extracts and curcumin exhibit an anti-inflammatory and anti-catabolic effect on human intervertebral disc cells, possibly by influencing TLR2 expression and JNK activity. *Journal of Inflammation* 2012, 9:29.
17. Martinovitch, P. "The development in vitro of the mammalian gonad. Ovary and ovogenesis. " *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (1938). 125(839): 232-249.
18. Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(12): 7634–7638.
19. Neal, P. T, Baker G. Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. I Examination of critical time intervals. *J Reprod Fertil* 1973; 33,399-410.



20. Richard F. J, Sirard M. A. effect of harvest method of bovine oocytes co- cultured follicular hemi section in vitro on nuclear maturation. *Theriogenology* 1996; 46:1243-1250.
21. Togler D, Tu T, Smith R. M, Anderson N, Tingen C. M, Woodruff T. K, Shea L. D. Embryonic fibroblast enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. *Tissue engineering*. 2012; Part A: 1-12.
22. Fainstat, T. : Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. *Fert Steril* 1968; 19, 317-338.
23. Guo J, Wu W, Dong H, Fu Y, Chen X, He F, Liao L. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause. *BMC cell biology*. 2013; 14-18.
24. Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, et al. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2006; 73:298–305.
25. Heidari M, Karimpour Malekshah A, Parivar K, Khanbabaei R, Rafiei A. Effect of Fibroblast Co-culture on In Vitro Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. *Int J Fertil Steril*. 2011 Apr-Jun; 5(1): 1–8.
26. Hennet, M. L., Combelles C. "The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. " *The International journal of developmental biology* 2012; 56(3): 819-831.

