

The Effect of Low-Level Laser Therapy on the Expression of 3 β -HSD and StAR Genes in the Ovaries of NMRI Mice

Mehdi Aghamardi¹,
Mitra Barzroodipour^{2,3},
Nastaran Azarbarz^{2,3},
Mohammadreza Bayatiani⁴,
Mohammad Bayat^{2,3}

¹ MSc in Anatomical Sciences, Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Medical Physics and Radiotherapy, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received February 16, 2025; Accepted June 8, 2025)

Abstract

Background and purpose: Ovulation induction increases the number and quality of oocytes, thereby enhancing fertility. However, it is associated with complications such as ovarian hyperstimulation syndrome, apoptosis, and oxidative stress, which may negatively affect oocyte quality. Low-level laser therapy (LLLT), by modulating cellular activity and increasing the expression of genes involved in steroidogenesis, has the potential to improve ovarian function. This study aimed to investigate the effect of LLLT on the expression of 3 β -HSD and StAR genes involved in the steroidogenesis pathway, as well as on the number and quality of oocytes and the histological features of ovaries in female NMRI mice.

Materials and methods: In this experimental study, 32 adults female NMRI mice were divided into four groups: control, laser, PMSG, and PMSG & laser. Laser irradiation with a wavelength of 808 nm and a power of 60 mW was applied to the ovaries three times weekly for 21 days. After treatment, ovaries were collected for histological examination and gene expression analysis using real-time PCR. Additionally, the number and quality of oocytes were evaluated, and the data were statistically analyzed.

Results: The results showed that the size of primary and secondary follicles, as well as the expression of 3 β -HSD and StAR genes, significantly increased in the PMSG and combined PMSG & laser groups compared to the control and laser groups. The number of atretic follicles significantly decreased in the combined PMSG & laser group compared to the control and PMSG groups. The size of Graafian follicles was significantly larger in the combined group compared to the PMSG and laser groups. Oocyte quality was improved in both the PMSG and combined PMSG & laser groups.

Conclusion: Low-level laser therapy combined with ovulation induction significantly increases the expression of key steroidogenesis genes and improves ovarian histological parameters, thereby enhancing the number and quality of oocytes and overall ovarian function. Therefore, LLLT can be considered a promising complementary approach in infertility treatment.

Keywords: Low-level laser therapy, steroidogenesis, ovary, 3 β HSD, StAR, ovulation induction, NMRI mouse

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (247): 27-39 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Bayat - Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.(E-mail: dr.mbayat@arakmu.ac.ir)

بررسی اثر لیزر کم توان بر بیان ژن های $3\beta HSD$ و $StAR$ در تخمدان موش های نژاد NMRI

مهدی آقا مردی^۱

میترا برزودی پور^{۳،۲}

نسترن آذربرز^{۳و۲}

محمدرضا بیاتانی^۴

محمد بیات^{۳،۲}

چکیده

سابقه و هدف: تحریک تخمک گذاری با افزایش تعداد و کیفیت تخمک ها، شانس باروری را بالا می برد، اما همراه با عوارضی مانند سندروم تحریک بیش از حد تخمدان، آپوئوز و استرس اکسیداتیو است که ممکن است کیفیت تخمک ها کاهش دهد. لیزر کم توان (LLLT) با تأثیر بر فعالیت سلولی و افزایش بیان ژن های مرتبط با استروئیدوژنز، قابلیت بهبود عملکرد تخمدان را دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر لیزر کم توان بر بیان ژن های $3\beta HSD$ و $StAR$ دخیل در مسیر استروئیدوژنز، تعداد، کیفیت تخمک ها و ویژگی های بافت شناسی تخمدان موش های ماده نژاد NMRI، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ موش ماده بالغ به چهار گروه کنترل، لیزر، هورمون PMSG و ترکیبی از PMSG و لیزر تقسیم شدند. لیزر با طول موج ۸۰۸ نانومتر و توان ۶۰ میلی وات، سه بار در هفته به مدت ۲۱ روز به تخمدان ها تابانده شد. پس از دوره درمان، تخمدان ها برای بررسی های بافت شناسی و سنجش بیان ژن ها با روش *Real-time PCR* جمع آوری شدند. همچنین تعداد و کیفیت تخمک ها ارزیابی و داده ها تحلیل آماری شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد اندازه فولیکول های اولیه، ثانویه و بیان ژن $3\beta HSD$ و $StAR$ در گروه های دریافت کننده PMSG و PMSG + لیزر نسبت به گروه کنترل و لیزر افزایش معنی داری داشت. تعداد فولیکول های آتریک در گروه PMSG و لیزر نسبت به کنترل و PMSG کاهش معنی داری داشت. اندازه فولیکول های گراف در گروه ترکیبی PMSG و لیزر نسبت به گروه های PMSG و لیزر افزایش معنی داری یافت. کیفیت تخمک ها در گروه های دریافت کننده PMSG و PMSG + لیزر بهبود یافته بود.

استنتاج: لیزر کم توان همراه با تحریک تخمک گذاری با افزایش بیان ژن های کلیدی استروئیدوژنز و بهبود پارامترهای بافتی تخمدان، کیفیت و تعداد تخمک ها را افزایش داده و عملکرد تخمدان را بهبود می بخشد. بنابراین، لیزر کم توان می تواند به عنوان رویکرد مکمل درمان ناباروری مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: لیزر کم توان، استروئیدوژنز، تخمدان، $3\beta HSD$ ، $StAR$ ، تحریک تخمک گذاری، موش NMRI

E-mail: dr.mbayat@arakmu.ac.ir

مؤلف مسئول: محمد بیات - اراک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۱. کارشناسی ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲. استادیار علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴. دانشیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱۲/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۳/۱۸

مقدمه

روش های نوین درمان ناباروری با پیشرفت فناوری به طور چشمگیری افزایش یافته اند و به بهبود کیفیت درمان کمک می کنند (۱). تحریک تخمک گذاری مزایایی مانند افزایش تعداد و کیفیت تخمک ها و بهبود شانس بارداری دارد، اما عوارضی مانند سندروم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS) Ovarian (Hyperstimulation Syndrome)، آپوپتوز و استرس اکسیداتیو نیز به همراه دارد که می تواند رشد طبیعی فولیکول ها و کیفیت تخمک را مختل کند (۲).

لیزرهای کم توان (LLLT: Low level laser Therapy)، نوعی لیزر با تابش غیر حرارتی نور قرمز و نزدیک مادون قرمز (طول موج ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر) هستند که بر فعالیت های سلولی تأثیر می گذارند و در درمان درد، التهاب و بهبود زخم ها کاربرد دارند (۳). نور از طریق کروموفورهایی مانند سیتوکروم های میتوکنندری، اپسین ها و کانال های یونی کلسیم جذب می شود و باعث آزادسازی مواد مؤثر مانند نیتریک اکسید و افزایش کلسیم داخل سلولی می گردد (۳). این فرآیندها به فعال شدن فاکتورهای رونویسی و افزایش بیان ژن های مرتبط با سنتز پروتئین و سیگنال دهی ضد التهابی کمک می کنند. هم چنین، لیزر کم توان گردش خون میکروسکوپی را افزایش داده و با آزادسازی موادی مانند هیستامین باعث انبساط عروقی و افزایش متابولیسم سلولی می شود. این مکانیسم ها موجب بهبود عملکرد سلولی و کاهش التهاب در بافت ها می گردند (۴).

لیزرهای کم توان با افزایش فولیکول های اولیه و بهبود کیفیت تخمک ها، نقش موثری در تقویت تولید مثل و افزایش موفقیت لقاح مصنوعی دارند (۵). هم چنین، این فناوری با افزایش ATP، کیفیت و حرکت اسپرم را بهبود بخشیده در درمان تخمک های نابالغ و تحریک واکنش آکروزومی مؤثر است (۶، ۷).

تابش لیزر کم توان موجب افزایش فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فعالیت Mitogen-

activated protein kinases (MAPK) در سلول های گرانولوزا می شود که باعث افزایش رگ زایی، تخمک گذاری و رشد فولیکولی می گردد (۸). سلول های گرانولوزا و تکا هورمون های استروئیدی مانند استرادیول و پروژسترون تولید می کنند که نقش مهمی در سلامت و بقای فولیکول دارند (۹). پروتئین های StAR یا (Steroidogenic acute regulatory) و 3 β HSD یا (3- β -hydroxysteroid dehydrogenase) عوامل کلیدی در استروئیدوژنز بوده، کیفیت تخمک و نتایج بارداری را تحت تأثیر قرار می دهند (۱۰، ۱۱). میتوکنندری ها محل اصلی بیوسنتز هورمون های استروئیدی هستند که انتقال کلسترول به میتوکنندری توسط پروتئین StAR انجام می شود (۱۲). سپس کلسترول به پروگنولون تبدیل شده با کمک آنزیم 3 β HSD به پروژسترون تبدیل می گردد (۱۳). اولین مطالعه درباره تأثیر لیزر کم توان بر سلول های گرانولوزا در سال ۱۹۸۳ نشان داد که تابش لیزر ۶۳۰ نانومتر، بیان آنزیم 3 β HSD را افزایش داده سطح استروژن را بالا می برد و پروژسترون را تنظیم می کند (۱۴). استفاده از این لیزر باعث افزایش رشد فولیکولی، وزن تخمدان، سطح پروژسترون و بیان هورمون AMH و کاهش آپوپتوز در فولیکول های آنترال موش های تحت درمان با سیکلوفسفامید شد. هم چنین تابش موضعی لیزر کم توان آسیب عروقی تخمدان را کاهش می دهد (۱۵). مطالعات دیگر نشان دادند که تابش مستقیم لیزر از طریق واژن تعداد فولیکول های اولیه را افزایش می دهد (۱۶). لیزر درمانی کم توان (LLLT) به عنوان روشی نوین در بهبود عملکرد سلولی و کاهش استرس اکسیداتیو شناخته شده است و تحریک تخمک گذاری با هورمون PMSG نیز به طور گسترده ای برای افزایش تعداد و کیفیت تخمک ها به کار می رود. مطالعات پیشین عمدتاً اثرات لیزر کم توان را به تنهایی یا ترکیب با داروهای شیمیایی (مانند سیکلوفسفامید) بررسی کرده اند (۱۷). اطلاعات کمی درباره اثرات ترکیبی آن ها بر بیان ژن های

استروئیدوژن و ساختار فولیکولی تخمدان وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی همزمان اثر تحریک تخمک‌گذاری و لیزر درمانی کم‌توان بر بیان ژن‌های کلیدی 3β HSD و StAR و عملکرد فولیکول‌های تخمدانی، تعداد و کیفیت اووسیت‌های استخراج شده در مدل موش NMRI است که می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی و بهبود روش‌های درمان ناباروری کمک کند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، از ۳۲ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI با وزن ۳۰-۲۵ گرم (تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، ایران) استفاده شد. حیوانات در حیوانخانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک در دمای اتاق ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد، چرخه استاندارد ۱۲ ساعت نور و تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. در مراحل کار، دستورالعمل اخلاق کار با حیوانات مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد اخلاق IR.ARAKMU.AEC.1402.013 مورد توجه قرار گرفت.

طراحی مطالعه

در این مطالعه موش‌ها به صورت تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی، کنترل (کنترل)، دریافت کننده لیزر (لیزر)، دریافت کننده هورمون PMSG (PMSG)، دریافت کننده هورمون PMSG و لیزر (PMSG & L) قرار گرفتند. لیزر با طول موج 808nm و برای 18 ثانیه، ۳ بار در هفته به مدت ۲۱ روز تابانده شد (۱۸). در گروه‌های دریافت کننده هورمون PMSG، بعد از این مدت، تحریک تخمک‌گذاری با هورمون‌های مربوطه انجام شد. در گروه‌های کنترل و لیزر جهت تعیین زمان تخمک‌گذاری، با استفاده از اسمیر واژن مرحله استروس حیوان تعیین شد. تخمک‌ها از ناحیه آمپول جمع‌آوری شدند. کمیت و کیفیت تخمک‌ها مورد

ارزیابی قرار گرفت. تخمدان راست برای بررسی بیان ژن‌های 3β HSD و StAR و سمت چپ جهت انجام مطالعات بافت‌شناسی استفاده شد.

پروتکل تابش لیزر

موهای ناحیه پشتی-شکمی حیوانات به صورت دو طرفه تراشیده شده و به صورت دستی مهار شدند و سپس تحت تابش لیزر (یونیکس ۱۶۰۰، آرمان پویا، ایران) با طول موج ۸۰۸ نانومتر و توان ۶۰ میلی‌وات و با دوز 1 J(J)/point، به مدت ۱۸ ثانیه قرار گرفتند. زاویه و محل تابش لیزر با توجه به آناتومی سطحی تخمدان در موش آزمایشگاهی انجام شد. تابش لیزر بر روی هر تخمدان سه بار در هفته و در مجموع ۲ ژول انرژی در روز تابیده شد (۱۷). طول درمان سه بار در هفته به مدت ۲۱ روز انجام شد.

جمع‌آوری تخمک و تخمدان

پس از تیمار با لیزر، حیوانات گروه‌های مطالعه ابتدا با هورمون PMSG (۷/۵ واحد) و پس از ۴۸ ساعت با هورمون HCG (۱۰ واحد) به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. ۱۲ ساعت پس از تزریق HCG، حیوانات با روش آسان‌کشی کشته شدند. پس از باز کردن حفره شکم، دو تخمدان جدا شدند؛ یکی برای بررسی‌های بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین به فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد و دیگری برای استخراج RNA ابتدا در بخار نیتروژن منجمد و سپس در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد. لوله رحم از شاخ رحم جدا و به محیط کشت منتقل شد. با باز کردن دیواره آمپول لوله رحم، تخمک‌ها آزاد و به محیط کشت M2 منتقل شدند (۱۹). تعداد کل تخمک‌ها شمارش و تخمک‌های دارای جسم قطبی (PBE) جهت ارزیابی کیفیت مشخص شدند.

بررسی بافت‌شناسی تخمدان

بعد از فیکس کردن تخمدان و انجام مراحل آب‌گیری با الکل و شفاف‌سازی با گزلیل، قالب‌های

پارافینی از نمونه‌ها تهیه و برش‌های ۵ میکرومتری زده شد. بعد از انجام مراحل رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین و چسباندن لامل، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای بررسی دقیق ساختارهای تخمدان، ۵ برش نازک (هر کدام به ضخامت ۵ میکرومتر) از هر تخمدان به صورت منظم و متوالی تهیه شد تا تمام نواحی تخمدان پوشش داده شود. این نمونه‌ها نماینده کل تخمدان بوده و تمام سطوح زیر میکروسکوپ نوری بررسی و شمارش شدند. فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آنتریک و گراف به دقت شمارش و طبقه‌بندی شدند و اندازه هر فولیکول با نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری گردید تا دقت داده‌ها حفظ شود.

استخراج RNA و ساخت cDNA

نمونه‌ها از فریزر خارج شده و روی یخ قرار گرفتند RNA کل با کیت RNX-P (سیناژن، ایران) استخراج و در آب تیمار شده با DEPC حل شد. غلظت و کیفیت RNA با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (نسبت ۲۸۰/۲۶۰) توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. از ۲ میکروگرم RNA برای ساخت cDNA با استفاده از کیت مخصوص (یکتا تجهیز، ایران) استفاده گردید. cDNA ساخته شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد.

واکنش (Real-time Polymerase Chain Reaction)

Real-time PCR

پس از استخراج RNA و ساخت cDNA از نمونه‌ها، بیان ژن‌های *3-βHSD* و *StAR* و ژن کنترل *GAPDH* با روش Real-time PCR بررسی شد. آزمایش با دستگاه Roche Life Cyclor 96 انجام گرفت. حجم کل واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر اختصاصی، ۱۰ میکرولیتر محلول سایبرگرین و ۷ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز بود (جدول

شماره ۱). واکنش‌ها به صورت تکرار دوتایی انجام شد. داده‌ها به شکل چرخه آستانه (CT) استخراج و بیان نسبی ژن‌ها با روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه گردید.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر ژن‌ها

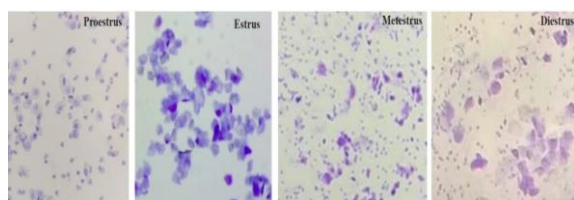
ژن	توالی پرایمر (5'-3')	طول محصول PCR (bp)
<i>3-βHSD</i>		
Sense	GAAGGAGACATTCTTGACACCCA	۱۵۳
Antisense	CTCCAATAAGTTCTGGGTACCTTTCA	
<i>StAR</i>		
Sense	AGGATTAAGGCACCAAGC	۱۲۳
Antisense	AGTTGAGAACCAAGCAGAG	
<i>GAPDH</i>		
Sense	AGCAAGGACACTGAGCAAGAG	۱۵۲
Antisense	GCAGCGAACTTTATTGATGGT	

آنالیز آماری

داده‌ها با نرم‌افزار Prism GraphPad 8 تحلیل شدند. نرمالیتی داده‌های فولیکولی و هیستولوژیک با آزمون شاپیرو-ویلک تأیید شد، لذا از آزمون‌های پارامتریک استفاده گردید. تفاوت میانگین‌ها با ANOVA یک طرفه بررسی و در صورت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$)، از آزمون توکی برای مقایسه گروه‌ها بهره گرفته شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند و سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ برای اختلاف بین گروهی در نظر گرفته شد.

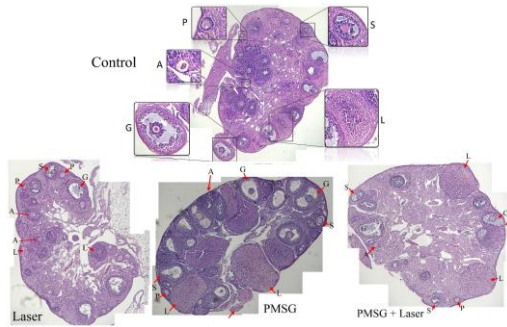
یافته‌ها

در گروه‌های کنترل و لیزر جهت تعیین زمان تخمک‌گذاری، با استفاده از اسمیر واژن مرحله استروس حیوان تعیین شد (تصویر شماره ۱).



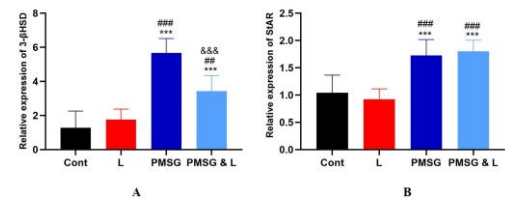
تصویر شماره ۱: تعیین چرخه فحلی با استفاده از سیتولوژی واژن بیان ژن *3-βHSD*

(تصویر شماره ۴، A). اما اندازه فولیکول های اولیه در گروه های دریافت کننده PMSG و دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل و لیزر افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۴، B).

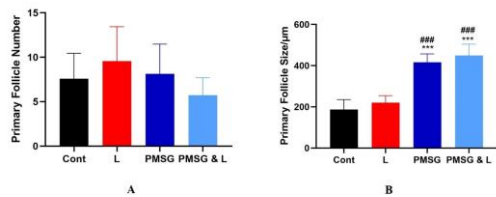


تصویر شماره ۳: تصویر بافت شناسی تخمدان با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، در این شکل فولیکول های اولیه (P) با حضور یک یا دو ردیف سلول گرانولوزی مکعبی، فولیکول ثانویه (S) با چندین لایه سلول گرانولوزا در اطراف تخمک، فولیکول آتریکی (A) با از بین رفتن تعداد زیادی سلول گرانولوزا و اتصال سست بین آن ها و فولیکول های گراف (G) با حضور تخمک که توسط چندین لایه سلول گرانولوزا در برگرفته شده و در بین آن ها یک فضای حاوی مایع وجود دارد و جسم زرد (لیزر) یک ساختار توپر سلولی که از سلول های گرانولوزا لوتال و نکال لوتال تشکیل شده است، قابل تشخیص هستند، بزرگنمایی $\times 10$

تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که میزان بیان ژن $3\beta\text{HSD}$ در گروه های دریافت کننده PMSG و دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ($P < 0/001$) داشت. بیان این ژن در گروه دریافت کننده PMSG، ($P < 0/001$) و دریافت کننده PMSG و لیزر ($P < 0/01$) نسبت به گروه لیزر افزایش معنی داری را نشان داد. ولی در گروه دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه دریافت کننده PMSG، کاهش معنی داری ($P < 0/001$) را در بیان این ژن مشاهده گردید (تصویر شماره ۲، A).



تصویر شماره ۲: میزان بیان ژن $3\beta\text{HSD}$ (A) و میزان بیان ژن StAR (B)، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *: معنی داری با کنترل، #: معنی داری با لیزر، &: معنی داری با دریافت کننده PMSG، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است



تصویر شماره ۴: بررسی تعداد (A) و اندازه (B) فولیکول های اولیه، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *: معنی داری با کنترل، #: معنی داری با لیزر. مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

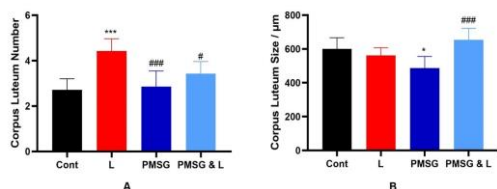
تعداد و اندازه فولیکول های ثانویه: فولیکول های ثانویه که با حضور چندین لایه سلول گرانولوزا در اطراف تخمک مشخص می شوند که در مقاطع بافتی شمارش شدند (تصویر شماره ۳). بررسی های بافت شناسی

بیان ژن StAR نتایج نشان داد که سطح بیان ژن StAR در گروه دریافت کننده PMSG و دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل و لیزر افزایش معنی داری دارد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۲، B).

مطالعات بافت شناسی

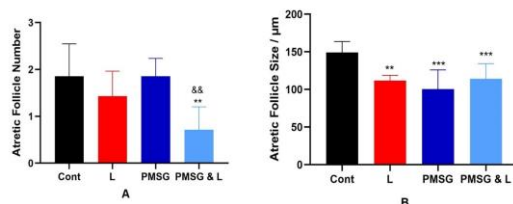
تعداد و اندازه فولیکول های اولیه: فولیکول های اولیه در کلیه مقاطع بافتی مورد بررسی قرار گرفتند. این فولیکول ها با حضور یک یا دو ردیف سلول گرانولوزای مکعبی شکل مشخص می شوند (تصویر شماره ۳). نتایج نشان داد که بین تعداد فولیکول های اولیه در گروه های مورد مطالعه تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$)

به گروه لیزر مشاهده شد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۶، B).



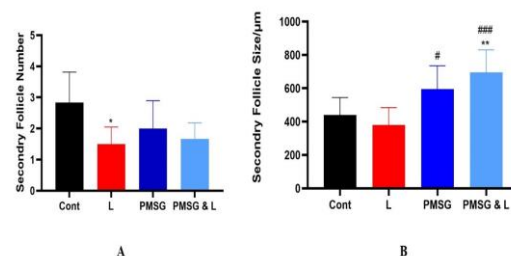
تصویر شماره ۶: بررسی تعداد (A) و اندازه (B) جسم زرد، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *: معنی داری با کنترل، #: معنی داری با لیزر، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

تعداد و اندازه فولیکول‌های آترتیک: این فولیکول‌ها با از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌های گرانولوزا و اتصال سست بین آن‌ها، همچنین تمایز سلول‌های تکا و از بین رفتن سلول‌های فولیکول مشخص می‌شوند (تصویر شماره ۳). تعداد فولیکول‌های آترتیک در گروه دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل و دریافت کننده PMSG کاهش معنی داری داشت ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۷، A). همچنین اندازه فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های لیزر ($P < 0/001$)، دریافت کننده PMSG و دریافت کننده PMSG و لیزر ($P < 0/001$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (تصویر شماره ۷، B).



تصویر شماره ۷: بررسی تعداد (A) و اندازه (B) فولیکول آترتیک، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *: معنی داری با کنترل، #: معنی داری با لیزر، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

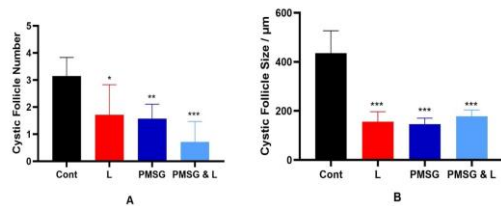
نشان داد که کاهش تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه لیزر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ($P < 0/05$) داشت. ولی تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های دیگر تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0/05$) (تصویر شماره ۵، A). اندازه فولیکول‌های ثانویه در گروه دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$). همچنین اندازه این فولیکول‌ها در هر دو گروه دریافت کننده PMSG ($P < 0/05$) و دریافت کننده PMSG و لیزر ($P < 0/001$) نسبت به گروه لیزر افزایش معنی داری را نشان داد (تصویر شماره ۵، B).



تصویر شماره ۵: بررسی تعداد (A) و اندازه (B) فولیکول‌های ثانویه، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *: معنی داری با کنترل، #: معنی داری با لیزر، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

تعداد و اندازه جسم زرد: جسم زرد یک ساختار توپر سلولی که از سلول‌های گرانولوزا لوتئال و تکا لوتئال تشکیل شده است (تصویر شماره ۳). تعداد جسم زرد در گروه لیزر نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشته است ($P < 0/001$). تعداد جسم زرد در گروه‌های دریافت کننده PMSG ($P < 0/001$) و دریافت کننده PMSG و لیزر ($P < 0/05$) نسبت به گروه لیزر کاهش معنی داری را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۶، A). همچنین اندازه جسم زرد در گروه دریافت کننده PMSG نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری دارد ($P < 0/05$). در حالی که افزایش معنی داری در اندازه جسم زرد در گروه دریافت کننده PMSG و لیزر نسبت

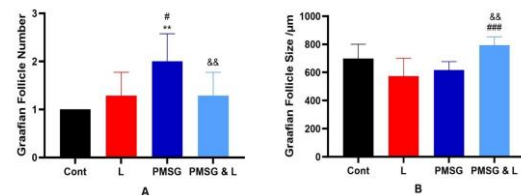
دریافت‌کننده ($P < 0/01$) و دریافت‌کننده PMSG و لیزر ($P < 0/001$) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشته است (تصویر شماره ۹، A). همچنین اندازه این فولیکول‌ها در گروه لیزر، دریافت‌کننده PMSG و دریافت‌کننده PMSG و لیزر کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($P < 0/001$) (تصویر شماره ۹، B).



تصویر شماره ۹: تعداد (A) و اندازه (B) فولیکول‌های کیستیک، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت‌کننده PMSG (PMSG) و دریافت‌کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *؛ معنی‌داری با کنترل، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است

تعداد و کیفیت تخمک‌ها: بعد از جمع‌آوری تخمک‌ها از آمپول لوله رحم موش‌های گروه‌های مورد مطالعه، ابتدا تعداد تخمک‌های آزاد شده در هر گروه شمارش شد و سپس جهت ارزیابی کیفیت تخمک‌ها، تعداد تخمک‌های دارای جسم قطبی (MII) یا بالغ شمارش شدند (تصویر شماره ۱۰). تعداد تخمک در گروه دریافت‌کننده PMSG و گروه دریافت‌کننده PMSG و لیزر افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ($P < 0/001$). همچنین تعداد تخمک‌های آزاد شده در گروه دریافت‌کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه لیزر افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۱۱، A). تعداد تخمک‌های دارای جسم قطبی در گروه‌های دریافت‌کننده PMSG و دریافت‌کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$)، همچنین افزایش معنی‌داری در تعداد

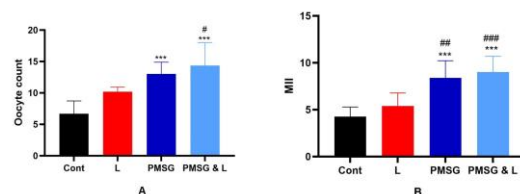
تعداد و اندازه فولیکول‌های گراف: این فولیکول‌ها با حضور تخمک که توسط چندین لایه سلول گرانولوزا در بر گرفته شده و در بین آن‌ها یک فضای حاوی مایع وجود دارد مشخص می‌شود (تصویر شماره ۳). تعداد فولیکول‌های گراف در گروه دریافت‌کننده PMSG نسبت به کنترل ($P < 0/01$) و لیزر ($P < 0/05$) افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین تعداد این فولیکول‌ها در گروه دریافت‌کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه دریافت‌کننده PMSG کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/01$) (تصویر شماره ۸، A). اما اندازه فولیکول‌های گراف در گروه دریافت‌کننده PMSG و لیزر نسبت به گروه لیزر ($P < 0/001$) و دریافت‌کننده PMSG ($P < 0/01$) افزایش معنی‌داری را نشان داد (تصویر شماره ۸، B).



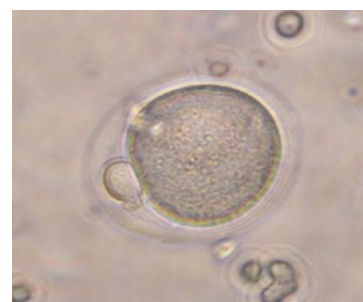
تصویر شماره ۸: بررسی تعداد (A) و اندازه (B) فولیکول‌های گراف، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت‌کننده PMSG (PMSG) و دریافت‌کننده PMSG و لیزر (PMSG&L)، *؛ معنی‌داری با کنترل، #؛ معنی‌داری با لیزر، &؛ معنی‌داری با دریافت‌کننده PMSG، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

تعداد و اندازه فولیکول‌های کیستیک: کیست‌ها با یک لایه داخلی از سلول‌های گرانولوزا به شکل مکعبی پوشیده شده‌اند که ممکن است یک تا چهار لایه ضخامت داشته باشند. اطراف این سلول‌ها، لایه‌ای بیرونی از سلول‌های تکا وجود دارد که گاهی به سلول‌های لوتئال تبدیل می‌شود. دیواره کیست معمولاً نازک و از بافت فیبری تشکیل شده است. همچنین ممکن است حاوی بقایای تخمک‌های در حال تخریب، بقایای سلولی یا ماکروفاژهای کف‌آلود باشد (تصویر شماره ۳). تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه‌های لیزر ($P < 0/05$)،

تخمک‌های بالغ در گروه‌های دریافت کننده PMSG ($P < 0/01$) و دریافت کننده PMSG و لیزر ($P < 0/01$) نسبت به گروه لیزر مشاهده شد (تصویر شماره ۱۱، B).



تصویر شماره ۱۰: تخمک دارای جسم قطبی (MII) یا بالغ



تصویر شماره ۱۱: تعداد کل تخمک‌های شمارش شده (A) و تعداد تخمک‌های بالغ (B)، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، دریافت کننده PMSG (PMSG) و دریافت کننده PMSG و لیزر (PMSG&L): * معنی داری با کنترل، # معنی داری با لیزر، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

بحث

در این مطالعه، تأثیر تحریک تخمک‌گذاری و لیزر درمانی کم‌توان (LLLT) بر بیان ژن‌های استروئیدوژنیک، ساختار و عملکرد فولیکول‌های تخمدانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو مداخله، به ویژه ترکیب آن‌ها، موجب افزایش بیان ژن‌های کلیدی در استروئیدوژنز، بهبود رشد فولیکولی، کاهش فولیکول‌های آترتیک و کیستیک، و ارتقای کیفیت و تعداد تخمک‌ها شدند. این یافته‌ها نشان دهنده نقش هم‌افزایی تحریک هورمونی و لیزر درمانی در عملکرد تخمدان است.

آنزیم $3\beta HSD3$ یکی از اجزای اصلی مسیر بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی است که در بافت‌های مختلف از جمله تخمدان وجود دارد و نقش مهمی در تنظیم

ویژگی‌های استروئیدوژنیک ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر، بیان ژن $3\beta HSD$ در گروه‌های دریافت کننده هورمون PMSG و دریافت کننده هورمون PMSG همراه با لیزر نسبت به کنترل و لیزر افزایش معنی داری داشت. این یافته با مطالعات قبلی همسو است. به طور مثال، Gregoraszczuk و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که لیزر کم‌توان می‌تواند بیان $3\beta HSD$ را در سلول‌های گرانولوزا افزایش دهد و غلظت استروژن را بالا ببرد (۲۰). هم‌چنین، تحریک تخمک‌گذاری به طور معمول موجب افزایش ترشح استروژن و تغییر الگوهای بیان ژن‌های مرتبط با استروئیدوژنز و بازسازی بافت تخمدان می‌شود (۲۱). با این حال، باید توجه داشت که تحریک تخمک‌گذاری می‌تواند عوارضی مانند سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)، آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در سلول‌های تخمدانی و اختلال در رشد طبیعی فولیکول‌ها و کیفیت تخمک را به دنبال داشته باشد (۲۲).

در مطالعه حاضر، کاهش بیان $3\beta HSD$ در گروه دریافت کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به گروه دریافت کننده هورمون PMSG مشاهده شد. این یافته ممکن است به اثرات محافظتی لیزر درمانی کم‌توان مربوط باشد که تولید بیش از حد آندروژن‌ها و مسیرهای آپوپتوز مرتبط با آن را کاهش داده باشد. این موضوع با مطالعاتی که نشان داده‌اند لیزر کم‌توان می‌تواند نشانگرهای التهابی و استرس اکسیداتیو را تنظیم کند و از آسیب سلولی جلوگیری نماید، همخوانی دارد (۲۳).

پروتئین StAR نیز برای انتقال کلسترول به میتوکندری و آغاز بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی ضروری است. در مطالعه حاضر، بیان ژن StAR در گروه‌های دریافت کننده هورمون PMSG و دریافت کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل و لیزر به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته با نتایج مطالعه Hamblin (۲۰۱۸) مطابقت دارد که نشان داد نور لیزر با طول موج ۸۱۰ نانومتر می‌تواند پتانسیل غشای میتوکندری و تولید ATP را افزایش دهد و عملکرد

سلولی را از طریق بهبود فعالیت میتوکندری و کاهش استرس اکسیداتیو تقویت کند (۲۴). بنابراین، ترکیب تحریک تخمک‌گذاری و لیزر درمانی احتمالاً از طریق این مکانیسم‌ها موجب افزایش بیان ژن StAR و بهبود فرآیندهای استروئیدوژن می‌شود.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که لیزر کم‌توان می‌تواند عملکرد میتوکندری را بهبود بخشد، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و فعالیت سلولی را افزایش دهد. در مطالعه حاضر، افزایش بیان StAR در هر دو گروه دریافت‌کننده هورمون PMSG و دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر مشاهده شد، اما بیان β HSD در گروه ترکیبی کاهش یافت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که لیزر درمانی ممکن است برخی جنبه‌های عملکرد تخمدان را تقویت کند و در عین حال بر مسیرهای خاص مرتبط با تولید هورمون‌های استروئیدی اثر بگذارد. تحقیقات بیش‌تر برای روشن شدن مکانیسم‌های زیرساختی این تغییرات و پیامدهای آن‌ها برای سلامت و باروری تخمدان‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

در بررسی ساختار فولیکولی، عدم تفاوت معنی‌دار در تعداد فولیکول‌های اولیه بین گروه‌ها نشان داد که لیزر درمانی کم‌توان عمدتاً بر مراحل نهایی فولیکول‌زایی اثرگذار است. این یافته با مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲ که افزایش معنی‌دار فولیکول‌های بدوی را در گروه لیزر نسبت به شاهد گزارش کرد، همخوانی ندارد (۱۶). با این حال، افزایش معنی‌دار اندازه فولیکول‌های اولیه در گروه‌های دریافت‌کننده هورمون PMSG و دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر، نشان دهنده نقش مثبت این مداخلات در رشد و تکثیر سلولی از طریق بهبود فعالیت میتوکندری و کاهش استرس اکسیداتیو است.

تأثیر لیزر بر تخمدان باعث رشد و تکامل بیش‌تر فولیکول‌های ثانویه و به دنبال آن آزادسازی تخمک و تشکیل جسم زرد شده است که این یافته با افزایش تعداد و کیفیت اووسیت‌ها همخوانی مستقیم داد. در نتیجه کاهش تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه لیزر نسبت به

کنترل مشاهده شد. در مقابل، افزایش اندازه فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های دریافت‌کننده هورمون PMSG و دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر می‌تواند بیانگر اثر هم‌افزای این دو مداخله در پیشرفت رشد و تکامل فولیکول‌ها باشد. افزایش معنی‌دار تعداد جسم زرد در گروه لیزر نسبت به کنترل نیز ممکن است به توانایی لیزر کم‌توان در تحریک گسترش عروقی و فرآیندهای لوتئینیزاسیون نسبت داده شود. کاهش تعداد و افزایش اندازه جسم زرد در گروه‌های دریافت‌کننده هورمون PMSG و دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به گروه لیزر، نشان دهنده تخمک‌گذاری کارآمدتر و عملکرد بهتر جسم زرد به دلیل مداخلات هورمونی و لیزری است. یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات سایر محققان در این زمینه همخوانی دارد (۱۶، ۲۵).

کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های آتریک در دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به کنترل و دریافت‌کننده هورمون PMSG و همچنین کاهش اندازه این فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف نسبت به کنترل، می‌تواند به توانایی لیزر کم‌توان در تنظیم آپوپتوز و کاهش سطح ROS نسبت داده شود (۲۶). این امر موجب بهبود بقای فولیکول‌ها و کیفیت آن‌ها می‌شود. افزایش تعداد فولیکول‌های گراف در گروه دریافت‌کننده هورمون PMSG نسبت به کنترل و لیزر نیز اثر تحریکی گنادوتروپین‌ها بر بلوغ فولیکولی را نشان می‌دهد. کاهش تعداد فولیکول‌های گراف در گروه دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به گروه دریافت‌کننده هورمون PMSG بیانگر نقش لیزر کم‌توان در مراحل نهایی رشد و بلوغ فولیکولی و ارائه فولیکول‌های با کیفیت بالاتر و به دنبال آن تخمک‌گذاری است. افزایش اندازه فولیکول‌های گراف در گروه دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به سایر گروه‌ها نیز می‌تواند ناشی از بهبود رگ‌زایی و جریان خون باشد (۵). یافته‌های مطالعه حاضر با مطالعه Oubina و همکاران (۲۰۲۱) که تأثیر مثبت لیزر کم‌توان بر رشد فولیکولی،

وزن تخمدان و کاهش آپوپتوز را در موش‌های آزمایشگاهی تیمار شده با سیکلوفسفامید گزارش کردند، همخوانی دارد (۱۵).

کاهش معنی‌دار تعداد و اندازه فولیکول‌های کیستیک در تمامی گروه‌های مداخله‌ای نسبت به کنترل مشاهده شد که این یافته نشان می‌دهد هر دو مداخله هورمونی و لیزری می‌توانند تشکیل کیست را کاهش دهند که احتمالاً ناشی از بهبود تنظیم هورمونی و کاهش آسیب اکسیداتیو است. مطالعات پیشین نیز نقش لیزر کم‌توان در کاهش التهاب، بهبود ثبات عروق و تنظیم مسیرهای غدد درون‌ریز را تأیید کرده‌اند (۱۶، ۲۶).

افزایش معنی‌دار در تعداد تخمک‌های آزاد شده و همچنین بهبود معنی‌دار کیفیت تخمک‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده هورمون PMSG و دریافت‌کننده هورمون PMSG و لیزر نسبت به گروه کنترل و لیزر نشان‌دهنده تأثیرات هم‌افزا و مثبت تحریک هورمونی و لیزر درمانی کم‌توان است. تحریک تخمک‌گذاری باعث فعال شدن فولیکول‌ها می‌شود، در حالی که لیزر کم‌توان با بهبود عملکرد میتوکندری و کاهش استرس اکسیداتیو، پاسخ تخمدان را افزایش می‌دهد. لیزر کم‌توان با تحریک تولید ATP، بهبود جریان خون و کاهش التهاب، عملکرد تخمدان را بهبود می‌بخشد و رشد فولیکول‌ها را گسترش می‌دهد. تحقیقات بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که لیزر کم‌توان می‌تواند فعالیت فولیکولی و میزان تخمک‌گذاری را نسبت به روش‌های سنتی مانند کلومیفن سترات افزایش دهد (۱۶، ۲۷). سلامت میتوکندری برای بلوغ تخمک حیاتی است، زیرا انرژی لازم برای تقسیم میوز و بلوغ سیتوپلاسمی را تأمین می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند که LLLT با

افزایش تولید ATP و کاهش سطح گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS)، کیفیت تخمک‌ها را حفظ می‌کند (۲۸). همچنین با بهبود رگ‌زایی که توسط لیزر کم‌توان تسهیل می‌شود، مواد مغذی بیش‌تری به فولیکول‌های در حال رشد می‌رسد و از این طریق از بلوغ تخمک‌ها حمایت می‌کند (۲۹). با توجه به این که این مطالعه به بررسی اثر لیزر درمانی کم‌توان بر ساختار و عملکرد فولیکول‌های تخمدانی می‌پردازد، اما مطالعات بیش‌تری در خصوص توانایی تخمک‌های بالغ به دست آمده جهت لقاح درون آزمایشگاهی می‌تواند نتایج جالب توجهی داشته باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، لیزر درمانی کم‌توان می‌تواند بر عملکرد تخمدان تأثیر مثبت بگذارد و بیان ژن‌های مرتبط با استروئیدوژنز را تنظیم کند. استفاده همزمان از تحریک هورمونی و LLLT ممکن است منجر به تعادل بهتر در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با باروری و کاهش عوارض تحریک تخمک‌گذاری به تنهایی باشد. با این حال، برای بررسی توانایی تخمک‌های بالغ به دست آمده جهت لقاح درون آزمایشگاهی و پیامدهای آن، مطالعات بیش‌تری مورد نیاز است.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر بر اساس پایان‌نامه کارشناسی ارشد به شماره (۷۱۸۸) مورد تأیید معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. نویسندگان مقاله حاضر هیچ گونه تعارض منافی نداشته‌اند. از همه کسانی که ما را در این راه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Gardner DK, et al. Textbook of assisted reproductive techniques. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2018.
2. Ioannidou PG, et al. How frequent is severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist triggering in high-risk

- women? A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2021; 42(3): 635-650. PMID: 33483281.
3. Sharma SK, Sardana S, Hamblin MR. Role of opsins and light or heat activated transient receptor potential ion channels in the mechanisms of photobiomodulation and infrared therapy. *J Photochem Photobiol* 2023; 13: 100160.
 4. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2016; 22(3): 348-364. PMID: 28070154.
 5. Oubiña G, et al. Lowlevel laser therapy (LLLT) modulates ovarian function in mature female mice. *Prog Biophys Mol Biol* 2019; 145: 10-18. PMID: 30500339.
 6. Abdel-Salam Z, Harith MA. Laser researches on livestock semen and oocytes: A brief review. *J Adv Res* 2015; 6(3): 311-317. PMID: 26257928.
 7. Karu TI. Lasers in infertility treatment: irradiation of oocytes and spermatozoa. *Photomed Laser Surg* 2012; 30(5): 239-241. PMID: 22551048.
 8. Kawano Y, et al. The production of VEGF involving MAP kinase activation by low level laser therapy in human granulosa cells. *Laser Ther* 2012; 21(4): 269-274. PMID: 24511196.
 9. Ting AY, Xu J, Stouffer RL. Differential effects of estrogen and progesterone on development of primate secondary follicles in a steroid-depleted milieu in vitro. *Hum Reprod* 2015; 30(8): 1907-1917. PMID: 26040480.
 10. Hamel M, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008; 23(5): 1118-1127. PMID: 18310048.
 11. Wathlet S, et al. New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression. *Fertil Steril* 2012; 98(2): 432-439. PMID: 22633264.
 12. Miller WL. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 165(Pt A): 18-37. PMID: 26960203.
 13. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res* 2011; 52(12): 2111-2135. PMID: 21976778.
 14. Gregoraszczuk E, Dobrowolski JW, Galas J. Effect of low intensity laser beam on steroid dehydrogenase activity and steroid hormone production in cultured porcine granulosa cells. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 1983; 21(2): 87-92. PMID: 6576968.
 15. Oubiña G, et al. Local application of low-level laser therapy in mice ameliorates ovarian damage induced by cyclophosphamide. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 531: 111318. PMID: 33989716.
 16. Al Sherbiney EM, et al. Induction of Ovulation using Low-Level Laser Biostimulation. *Open Access Maced J Med Sci* 2022; 10(B): 1876-1881.
 17. Oubiña G, et al. Local application of low level laser therapy in mice ameliorates ovarian damage induced by cyclophosphamide. *Mol Cell Endocrinol* 2021; 531: 111318. PMID: 33989716.
 18. Alves E, et al. Photobiomodulation can improve ovarian activity in polycystic ovary syndrome-induced rats. *J Photochem Photobiol B* 2019; 194: 6-13. PMID: 30897401.
 19. Miao Y, et al. Generation and assessment of high-quality mouse oocytes and embryos

- following nicotinamide mononucleotide administration. *STAR Protoc* 2021; 2(1): 100298. PMID: 33532742.
20. Gregoraszczuk E, Dobrowolski J, Galas J. Effect of low intensity laser beam on steroid dehydrogenase activity and steroid hormone production in cultured porcine granulosa cells. *Folia Histochem Cytochem* 1983; 21(2): 87-92. PMID: 6576968.
 21. Li L, et al. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front Physiol* 2021; 12: 730196. PMID: 34646156.
 22. Pakhomov SP, et al. Risk Factors and Methods for Predicting Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) in the in vitro Fertilization. *Arch Razi Inst* 2021; 76(5): 1461-1468. PMID: 35355759.
 23. Wang L, et al. The effect of low-level laser irradiation on the proliferation, osteogenesis, inflammatory reaction, and oxidative stress of human periodontal ligament stem cells under inflammatory conditions. *Lasers Med Sci* 2022; 37(9): 3591-3599. PMID: 36104643.
 24. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol* 2018; 94(2): 199-212. PMID: 29164625.
 25. El-Nourya MA, et al. Assessment of Laser Biostimulation in Induction of Ovulation. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; 6(7): 1193-1198. PMID: 30087721.
 26. Trajano LASN, et al. Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. *Lasers Med Sci* 2016; 31: 841-848. PMID: 26886589.
 27. Sherein S, Hossam Eldein MJ. Comparative studies on the therapeutic effect of low power laser biostimulation and clomid on the treatment of polycystic ovarian disease. *Egypt J Comp Path Clin Path* 2009; 22(1): 113-129.
 28. Saremi AJ. Low-Level Laser Therapy (LLLT): A Promising Innovation in Fertility Enhancement. *Sci J Med Res* 2024; 9(3): 135-137.
 29. Naseri P, Rasta SH, Alihemati AJ. A Comparison Between the Effect of Low-Level Laser Therapy and Clomiphene on Rats' Ovarian Tissue Blood Vessels Under In Vivo Conditions. *J Iran Med Counc* 2022.