مقاله پژوهشی

بررسی اثرات آگونیست GnRH بر روی میزان آپوپتوز سلولهای گرانولوزای فولیکولهای موش های صحرایی

تهمینه پیروی[۱]، شیوا روشن میلانی[۲]، سیامک سلامی[۳]، محمد قادری[۴]،علیرضا شمس[۵]

[۱] دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۳] استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۴] پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[۵] استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرج، کرج، ایران

نشانی نویسنده مسئول: ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، بخش بافت‌شناسی، دکتر تهمینه پیروی
E-mail: tpeirouvi@yahoo.co.uk

وصول: ۹۲/۱۲/۱۱، اصلاح:۹۳/۲/۶، پذیرش:۹۳/۳/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) علاوه بر هیپوتالاموس، در تخمدان هم تولید می شود و روی تمایز سلولی و ایجاد فولیکول های آترتیک تاثیر می گذارد. با توجه به این که مرگ سلول های گرانولوزا طی روند آترزی فولیکولی به واسطه پدیده آپوپتوز صورت می گیرد.ما در این مطالعه وقوع آپوپتوز در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدان موش صحرایی را تحت تاثیر یکی از آگونیست هایGnRH یعنی بوسرلین استات مورد بررسی قرار می دهیم.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی موردی ـ شاهدی دوازده سر موش صحرایی نژاد ویستار ماده ۲۵ روزه از خانه حیوانات به صورت غیر تصادفی و در دسترس تهیه و به دو گروه آزمایش و کنترل (n= ٦) تقسیم شدند. موش های صحرایی گروه آزمایش و کنترل به ترتیب روزانه به مقدار mg/kg ۰/۲ بوسرلین و سرم فیزیولوژیک به مدت چهار روز دریافت کردند. ٢٤ ساعت بعد از آخرین تزریق ، موش ها با دوز کشنده کلروفرم بیهوش ، سپس تخمدان ها خارج شدند .نمونه ها ابتدا در فرمالین ۱۰٪ فیکس و پس از پاساژ با استفاده از میکروتوم دوار از آنها مقاطع پنج میکرونی تهیه شد. برای بررسی آپوپتوز در برش های بافتی از روش تانل پی او دی استفاده شد. سپس داده ها با استفاده از نرم افزار Graphpad instant و آزمون independent t-test آنالیز شدند و سطح معنی داری p≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد میانگین درصد سلول های آپوپتوتیک در گروه کنترل (۰/۵۲ ±۲/۱٤) و در گروه آزمایش (۱/۷۱± ۳/۷۵) و (P≤ ۰/۰۰۰۱) بود. از نظر آماری این اختلاف افزایش معنی دار بود.

نتیجه گیری: این یافته ها بیانگر این مطلبند که بوسرلین ، آپوپتوز را در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدان افزایش می دهد .

کلمات کلیدی: *آپوپتوز*، TUNEL POD، *بوسرلین، سلول های گرانولوزای فولیکول، موش صحرایی*

مقدمه

در تخمدان از زمان بلوغ؛ رشد فولیکول‌ها توسط هورمون محرکه فولیکول(FSH) هیپوفیزی شروع می‌شود. قبل از بلوغ هر فولیکول از یک لایه سلول سنگفرشی در اطراف و اووسیت اولیه در مرکز تشکیل شده است(۱).

از زمان بلوغ با ترشح گنادوتروپین های هیپوفیزی فولیکول ها به طور متناوب در یکی از تخمدان ها شروع به رشد می نمایند. یعنی ابتدا ارگانل های داخل اووسیت اولیه افزایش یافته و سپس سلول های فولیکولی از حالت سنگفرشی به حالت مکعبی تبدیل شده و تکثیر می یابد و چندین لایه در اطراف اووسیت ایجاد می‌نمایند(۲).

سلول های حاصل از تقسیم را سلول های گرانولوزا می نامند که در رشد و تامین تغذیه اووسیت از طریق تماس در ناحیه زوناپلوسیدا نقش دارند(۱). فولیکول های رشد یافته و بالغ در اثر افزایش ترشح ناگهانی LH، پاره شده و اووسیت ثانویه آزاد می گردد(۲). ترشح گنادوتروپین ها(LH,FSH) که رشد و اوولاسیون فولیکول را کنترل می نمایند تحت کنترل ترشح پالسی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین(GnRH)هیپو تالاموسی است که با باز شدن کانال های کلسیمی آغاز و باعث به وجود آمدن سیکل جنسی می گردد(۳).

ترشح پالسی GnRH در کل سیکل جنسی یکسان نیست.در اوایل سیکل تخمدانی ترشح پالسی GnRH باعث رهایی بیش تر FSH و میزان کم تر LH می گردد که باعث رشد فولیکول ها می شود.در اواسط سیکل با افزایش پالس های GnRH ترشح LH نسبت به FSH بیش تر می گردد که مقدمه ای برای اوولاسیون است(٤). بعد از اوولاسیون پالس های GnRH به تدریج کاهش یافته و منجر به کاهش آزادسازی LH و FSH می گردد.بنابراین این روند به هماهنگی هورمون های هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی وابسته است(۵).

اختلال در هر یک از قسمت های فوق منجر به ناباروری می گردد. امروزه در دنیا برای رفع مشکل ناباروری روش های مختلفی رایج شده است که از جمله آن ها می توان به استفاده از آگونیست های صناعیGnRH مانند بوسرلین اشاره نمود. بوسرلین یکی از آگونیست های GnRH با دو استخلاف است. این دارو عملکرد هورمون آزاد کننده هیپوتالاموس را تقلید می‌کند(٦).

تجویز اولیه یا متناوب بوسرلین مانند تولید طبیعی LHRH از هیپوتالاموس ترشح هورمون لوتئال(LH) و هورمون محرک فولیکولی(FSH) را از هیپوفیز قدامی با افزایش گیرنده های GnRH تحریک می کند. با این وجود تجویز مداوم و روزانه بوسرلین ترشح FSHوLH را به علت تنظیم کاهشی گیرنده های GnRH مهار می نماید(٦).

تجویز بوسرلین جهت درمان ناباروری با دوز ۵۰۰-۲۰۰ میکروگرم روزانه به صورت زیر جلدی غیرپالسی در ابتدای فاز فولیکولار(روز اول قاعدگی)یا میانه فاز لوتئال(در روز ۲۱ قاعدگی)شروع شده و بایستی تا Down Regulation هیپوفیز ادامه یابد.در صورت نیاز دوز دارو به ۵۰۰ میکروگرم در روز وبه صورت دو بار تزریق زیرجلدی افزایش می یابد(٤). از این دارو به منظور جلوگیری از تحریک بیش از حد تخمدان ها به دنبال استفاده از داروهای محرک تخمک گذاری مانند کلومیفن سیترات وHMG وFSH جهت جلوگیری از رشد زودرس فولیکول ها استفاده می‌شود(٦).

با توجه به اهمیت سلول های گرانولوزا در رشد و تغذیه تخمک و استفاده روز افزون بوسرلین در مراکز نازایی و وجود مطالعات ناکافی در مورد اثر داروی مذکور در ایجاد آپوپتوز ما تصمیم به انجام بررسی حاضر گرفتیم.علت انتخاب موش های صحرایی نابالغ ترشح بسیار کم هورمون GnRH است. در نتیجه با تزریق بوسرلین هر گونه تغییر در تعداد سلول های آپوپتوتیک ناشی از تزریق می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی موردی_شاهدی دوازده سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار ۲۵ روزه از خانه حیوانات دانشکده پزشکی به صورت غیر تصادفی و در دسترس با میانگین وزنی ۱۰/۵۳± ٤٤/۳۷ گرم تهیه و به دو گروه آزمایش وکنترل(n= ٦) تقسیم شدند. موش های صحرایی گروه آزمایش و کنترل به ترتیب روزانه به مقدار mg/kg ۰/۲ آگونیست GnRH (Buserelin) ۱mg/ml (Aventis Pharma. Deutschland GmbH) و سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ (Clearflex, Switzerlandflex) به مدت چهار روزدریافت کردند(۷).۲٤ ساعت بعد ازآخرین تزریق موش های صحرایی گروه های آزمایش و کنترل ابتدا با اتر بی هوش و بافت تخمدان آنها از حفره شکم خارج شد. سپس نمونه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در فرمالین ۱۰٪ در دمای اتاق فیکس شدند. پس**از** انجام مراحل پاساژ بافت از نمونه ها برش های ۱۰-۷میکرونی تهیه و با کیت تانل پی او دی رنگ آمیزی شدند.

ابتدا اسلایدها را در محلول گزیلول جهت برداشت پارافین به مدت ۵ دقیقه در سه ظرف متوالی قرار داده شدند، سپس نمونه‌ها با الکل با درجات نزولی آبدهی و با بافر فسفات سالین(PBS) شستشو شدند. اسلایدها توسط پروتئیناز K (۳۰ µg /ml) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پرمئابلیزه و با PBS شسته شدند. برای بررسی میزان آپوپتوز از کیت Cell Death Detection (Roche) استفاده گردید . این کیت انتهای آزادOH ´3،DNA را به کمک ترمینال ترانسفراز اپتیمال (TdT) فلورسانس duTP نشان دار می نماید. سپس از یک آنتی‌بادی آنتی‌فلورسانس POD کونژوگه با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase= HRP) برای قابل مشاهده نمودن POD از دی آمینوبنزیدین به عنوان یک سوبسترا استفاده شد.

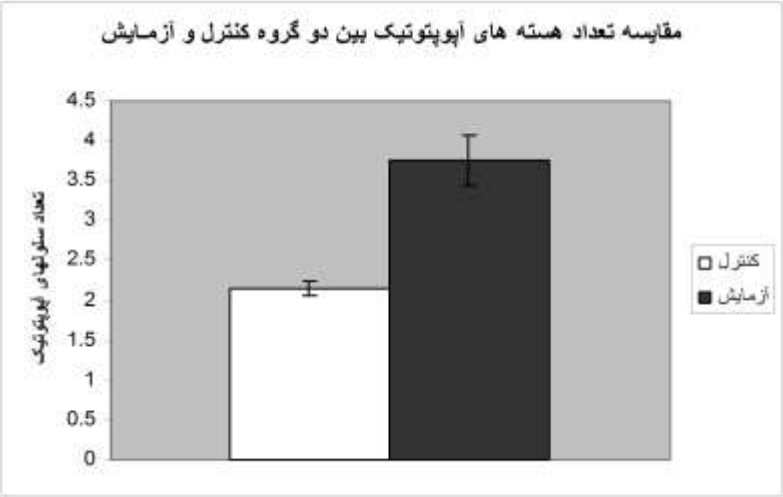
اسلایدها با مخلوط واکنش تانل به مدت ٦۰ دقیقه در محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس دوبار در PBS شستشو شدند. بعد از چند بار شستشو، دی‌آمینوبنزیدین (DiaminoBenzidin= DAB) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه شد. سپس در PBS شسته و بر روی لام برای مطالعه با میکروسکوپ نوری مونته شدند. برای کنترل جواب‌ها یک نمونه کنترل مثبت انجام دادیم و با DNase در DNA شکستگی القا نمودیم و تعداد سلول‌های تانل مثبت توسط دو کارشناس در فولیکول های تخمدان ها در نمونه کنترل و آزمایش شمارش شدند.برای تهیه عکس از بافت‌ها از میکروسکوپ Micros, Austria استفاده شده است. سپس داده ها توسط نرم افزار Graphpad instant و آزمون independent t-test مورد بررسی قرار گرفتند و سطح معنی داری p≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه ما سلول های گرانولوزایی آپوپتوتیک را در فولیکول های تخمدان که در مراحل مختلف رشد بودند با توجه به نوع رنگ آمیزی (TUNEL POD) زیر میکروسکوپ نوری شمارش نمودیم و از آن ها عکس تهیه شد. تا آن جایی که ممکن بود در تمام مقاطع تخمدانی و در همه فولیکول ها سلول های گرانولوزای آپوپتوتیک مورد شمارش قرار گرفت. نتیجه شمارش سلول های گرانولوزایی آپوپتوتیک را در گروه آزمایش (۱/۷۱ ± ۳/۷۵) و در گروه کنترل (۰/۵۲ ±۲/۱٤) نشان داد و نتیجه این که تجویز آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین ها (بوسریلین) میزان آپوپتوز را در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدانی به طور

جدول ۱: مقایسه میانگین سلول های آپوپتوتیک در گروه آزمایش و گروه کنترل

شاخص ها / گروه ها	گروه آزمایش (n =۶)	گروه کنترل (n =۶)	Pv
میانگین درصد سلول های آپوپتوتیک(Mean ±SD)	۱/۷۱ ± ۳/۷۵	۰/۵۲ ±۲/۱٤	۰/۰۰۰۱



نمودار۱: مقایسه میانگین درصد سلول های گرانولوزایی آپوپتوتیک در بین گروه های آزمایش و کنترل را نشان می دهد.

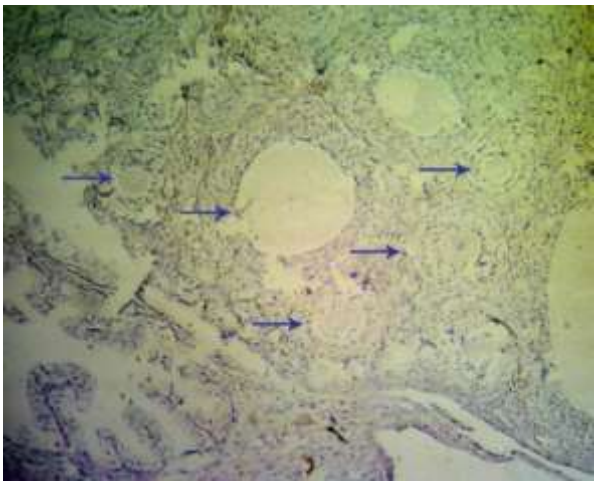
معنی داری افزایش می دهد(جدول۱) و (نمودار ۱) و (اشکال ۱الی ٤).

بحث

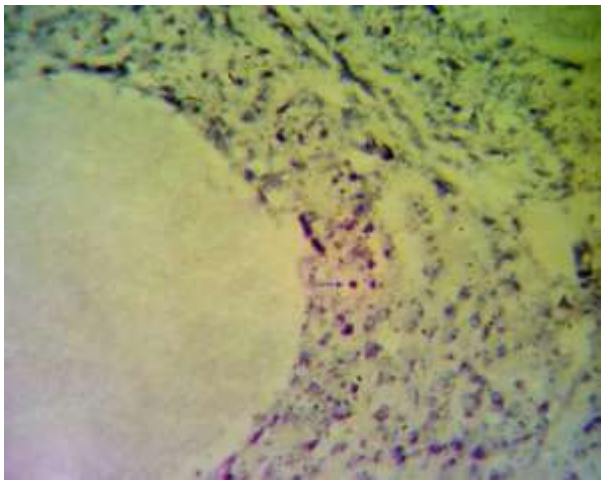
سلول های گرانولوزا از طریق کنترل بلوغ اووسیت و تولید هورمون های استروئیدی، استرادیول و پروژسترون نقش مهمی در انتخاب، رشد و پشتیبانی فولیکول های تخمدانی و سیکل تخمدانی دارد (۸). با توجه به اهمیت سلول های گرانولوزا در سیکل تخمدانی و استفاده ای که از آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین ها (بوسریلین) در مراکز نازایی جهت القای اوولاسیون و یا برای جلوگیری از رشد تعداد زیاد فولیکول های تخمدانی می گردد و نتایج مطالعه ما، که نشان داد که تجویز بوسریلین در رتهای ماده نابالغ باعث افزایش شکستگی DNA رابط نوکلئوزومها ی کروماتین هسته و باعث بروز تغییر آپوپتوتیک در سلول های گرانولوزا می گردد. می توان نتیجه گرفت که بوسریلین علیرغم مزایایی که دارد دارای مضراتی نیز می باشد.

مطالعات محققان قبلی نشان داد ه اند که بوسریلین از طریق گیرنده های هورمون آزاد کننده گنادوتروپین‌ها عملش را القا می کند و باعث افزایش آپوپتوز در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدانی می گردد. یک اندونوکلئاز اختصاصی مسئول شکستگی و هضم DNA به قطعات ۲۰۰-۱۸۰ جفت بازی در تخمدان وجود دارد. عمل این اندونوکلئاز وابسته به Ca/Mg است. احتمالا بوسریلین مسیر کلسیم را فعال کند و باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی و Turnover فسفاتیدیل اینوزیتول در سلول های گرانولوزا می گردد(۹). افزایش سطح کلسیم داخل سلولی و Turnover فسفاتیدیل اینوزیتول باعث آپوپتوز در سیستم های سلولی متعدد می گردد(۱۰و۸).

نتایج ما نشان داد که بوسریلین باعث افزایش معنی داری در میزان سلول های آپوپتوتیک می گردد وبا نتایج مطالعه Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد. نتایج آنها نشان داد که بوسریلین باعث افزایش مستقیم بروز آپوپتوز در کشت سلول‌های گرانولوزای انسانی و خوکی می شود. با توجه به این که آنها از دوز های مختلف آگونیست استفاده کرده بودند. پیشنهاد دادند که تعیین دوز کاربردی آگونیست GnRH در کلینیک با توجه به اثرات آپوپتوتیک آن باید با احتیاط صورت گیرد(۱۱). هم چنین با نتایج مطالعه Takekida و همکاران که بر روی اثرات مقایسه ای آگونیست GnRH بر تکثیر، آپوپتوز و تولید استرادیول و پروژسترون در کشت سلول‌های گرانولوزای خوک در مراحل مختلف تکامل فولیکول‌ها انجام داده بودند و نشان دادند که آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین اثر مهاری در

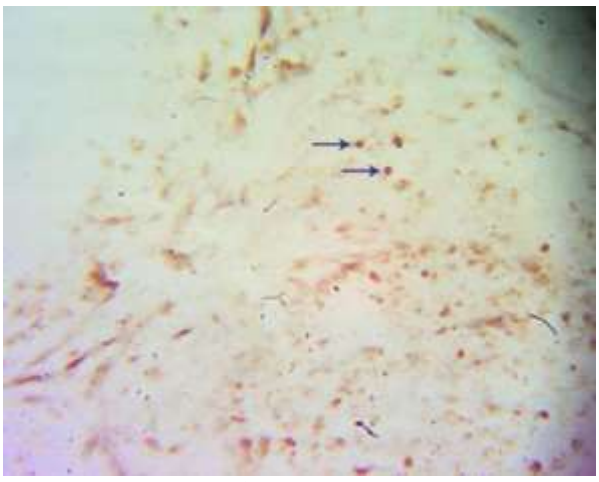


۱- فتومیکروگرافی از تخمدان موش صحرایی نابالغ گروه کنترل را با عدسی با بزرگنمایی ۱۰X را می‌بینید. در این میکروگراف فولیکول ها در مراحل مختلف رشد دیده می شوند. در این قسمت بر اساس نظر داورین محترم فلش دار شدند.



۲- فتومیکروگرافی از سلول های گرانولوزایی دیواره فولیکول گروه کنترل با عدسی با بزرگنمایی۴۰Xرا می بینید در این شکل نوک فلش هسته آپوپتوتیک را نشان می دهد.

۳- فتومیکروگرافی از تخمدان موش صحرایی نابالغ گروه آزمایش با عدسی با بزرگنمایی ۱۰X می‌بینید. در این فتو میکروگراف فولیکول ها در مراحل مختلف رشد دیده می شوند.



٤-فتومیکروگرافی از سلول های گرانولوزایی آپوپتوتیک دیواره فولیکول گروه آزمایش با عدسی با بزرگنمایی۴۰Xرا می بینید در این فتومیکوگراف نوک فلش ها هسته های آپوپتوتیک را نشان می دهند .

تکثیر و تولید هورمون ولی اثر مثبت بر روی آپوپتوز نشان می‌دهد. اثر مهاری آگونیست هورمون ازاد کننده گنادوتروپین در ترشح هورمون ها در سلول های گرانولوزای فولیکول های بزرگ غالب بود در حالی‌که اثر مثبت در آپوپتوز در سلول های گرانولوزا صرف نظر از مرحله رشد فولیکول یکسان بود مطابقت داشت(۱۲).

علیرغم این که تحقیقات نشان داده اند که بین هورمون ازاد کننده گنادوتروپین ها، آنالوگ های آن و آپوپتوز سلول های گرانولوزایی ارتباط وجود دارد. ولی هنوز ماهیت این ارتباط و مکانیسم های دخیل در آن در هاله‌ای از ابهام قرار دارند. شناخت کامل آپوپتوز، عوامل دخیل در آن و فاکتورهای تنظیم و متعادل کننده آن اهمیت به سزایی در کشف مکانیسم های ایجاد کننده آپوپتوز دارد. همان طوری که در تمامی بافت های بدن حفظ تعادل بین عوامل آپوپتوتیک و ضد آپوپتوتیک اهمیت به سزایی دارد و مختل شدن این تعادل می‌تواند از یک سو به نفع ایجاد تغییرات دژنراتیو و از سوی دیگر باعث رشد سلول های سرطانی در بافت ها شود، در تخمدان به علت دخالت در مراحل سیکل های تخمک گذاری و روند تولید مثل اهمیت مضاعفی پیدا می‌کند. این یافته ها می تواند یک زمینه تحقیقاتی مناسب برای مطالعات آینده در مورد بافت تخمدان باشد.

References

1. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology, 7 th Ed, Conn appleton & Lange. 1992:441-8.
2. Sadler TW. langman`s medical embryology. 11th Ed, Maryland; lippincottwilliams&wilkins. 2010. 33-5.
3. Leslie JD. Text ofEndocryonology .3th edition, W.B saunders.1995. 252-4, 218-29, 151-9.
4. Danied R, Mishel JR, Val D, Rogerio A. Infertility contraception and Reproductive endocrinology. 3th Ed, black well. 1991: 807-23;104-24
5. Lenon S, Robert HG, Nathan GK: clinical Gynecologic Endocrinology and infertility. 5Th Ed. Williams &Wilkins.1994: 2-6.
6. Parborell F, Dain L, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist affects rat ovarian follicle development by interfering with FSH and growth factors on the prevention of apoptosis. Mol Reprod Dev. 2001; 60(2): 241-7.
7. Parvinen M, Vanha – Perttula T. Identification and enzyme quantitation of stages of seminiferous epithelium wavein rat. Anat Rec. 1972; 174 : 435 – 49.
8. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. Endocrinology. 1994;134(1): 245-52.
9. Gaido ML, Cidlowski JA. Identification , Purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. J Biol Chem. 1991; 266(28): 18580-5.
10. Mercep M, Weissman AM, Frank SJ, Klaussner RD, Ashwell JD. Activation-driven programmed cell death and T cell receptor expression. Science. 1989; 246(4934):1162-5.
11. Zhao S, Saito H, Wang X, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. Gynecol Obstet Invest. 2000; 49(1): 52-6.
12. Takekida S, Deguchi J, Samoto T, Matsuo H, Maruo T. Comparative analysisof the effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the proliferative activity, apoptosis, and steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells at varying stages of follicular growth. Endocrine. 2000; 12(1): 61-7.

Effects of GnRH agonist on follicular granulosa cell apoptosis of rats

Tahmineh Peirouvi.,
Associate Professor of Histology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Shiva Roshan Milani.,
Assistant Professor of Physiology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Siamak Salami.,
Assistant Professor of Biochemistry, Shaid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Mohammad Ghaderi.,
General Position, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Alireza Shams.,
Assistant Professor of Anatomy, Karaj University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Received:02/03/2014**, Revised:**26/04/2014**, Accepted:**31/05/2014

Corresponding author:
Dr. TahminehPeirouvi, Histology Section, Department of Anatomy, Nazloo Campus, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
E-mail: tpeirouvi@yahoo.co.uk

Abstract

Background: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) has been found to be expressed in ovaries in addition to hypothalamus to modulate cell differentiation and induces atretic follicles. Since the death of granulosa cells during the process of follicular atresia occurs by apoptosis phenomenon, in this study, we investigated the occurrence of apoptosis of granulosa cells of rat ovarian follicles under the influence of Buserelin acetate, a GnRH agonist.

Materials and Methods: In this experimental case-control study, twelve 25-day-old female Wistar rats were randomly divided into 2 groups. The study and control groups received 0.2 mg/kg/d Buserelin acetate and normal saline, respectively, for 4 days. 24 hours after the last injection, the rats were anesthetized with a lethal dose of chloroform and ovaries were removed. Specimens were fixed in 10% formalin. After the passage, five-micron sections were prepared using a rotary microtome. Measurement of apoptosis was performed using a calibrated light microscope after TUNEL POD staining. Data were analyzed in GraphPad InStat software using independent t-test. P ≤ 0/05 was statistically considered significant.

Results: These data showed the average percentage of apoptotic cells in the control group 2/14 ± 0/52, and in the experimental group 3/75 ± 1/71. This difference was statistically significant (p≤0.0001).

Conclusion: These findings suggest that Buserelin acetate increases apoptosis in the granulosa cells of ovarian follicles.

Keywords: *Apoptosis, TUNEL POD, Buserelin acetate, Granulosa cells, Rat*