

Immunohistochemical Analysis and Role of Secreted Frizzled-Related Protein-4 in Polycystic Ovary-Induced Rat

F. Jannesari ladani, M.Sc., G. Hossein, Ph.D.*, N. Jarooghi, M.Sc.,
H. Sepehri, Ph.D., B. Zeinali, Ph.D.

Animal Physiology Department, School of Biology, University College of Science,
University of Tehran, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14155-6455, Animal Physiology Department, School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Email: ghossein@Khayam.ut.ac.ir

Abstract

Received: 2/Apr/2008, Accepted: 22/Jul/2008

Objective: The role of Wnt signaling and its antagonist; secreted Frizzled Related Protein type 4 (sFRP4) was reported in rodent ovarian follicular development. This study examines immunolocalization of sFRP4 in ovaries of polycystic ovary (PCO) rat model and evaluates its role in follicular growth arrest and its premature differentiation.

Materials and Methods: PCO was induced with daily administration of testosterone propionate (TP) for 1 to 4 weeks while normal control rats were injected only with vehicle. The ovaries underwent histological examination, immunohistochemical analysis of sFRP4 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and apoptosis analysis.

Results: Four-week TP treatment significantly increased the primordial follicles, and significantly decreased the preantral and antral follicles compared to one week TP treatment. TP-treated animals had concomitantly, significant increase of sFRP4 immunoexpression in primordial, primary and preantral follicles as compared to one week TP-treated animals and control groups. Furthermore, sFRP4 immunostaining strongly co-localized in apoptotic granulosa cells. Interestingly, increased sFRP4 immunostaining was associated with increased StAR immunoexpression in follicular theca layer and stroma in four weeks TP-treated rats compared to one week TP-treated rats and control groups.

Conclusion: Our data showed a highly significant association between sFRP4 expression and apoptosis in ovaries of four week TP-treated animals. Moreover, co-localization of StAR and sFRP4 could suggest that sFRP4 may play a role in premature differentiation of follicles.

Keywords: PCO, sFRP4, Apoptosis, StAR, Wnt Signaling

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 4, Winter 2009, Pages: 242-249

آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی و نقش پروتئین ترشح یافته شبه فریزلد نوع ۴ در تخمدان پلی کیستیک موش صحرایی

فرناز جان نثاری لادانی، M.Sc.، قمرتاج حسین، Ph.D.*، ندا جروقی، M.Sc.، حوری سپهری، Ph.D.، بهمن زینلی، Ph.D.

دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری

پست الکترونیک: Email: ghossein@khayam.ut.ac.ir

مکیده

دریافت مقاله: ۸۷/۲/۳، پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۱

* **هدف:** بررسی مکان بیان sFRP4 در مدل تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovary; PCO) موش صحرایی و نقش آن در روند توقف رشد و تمایز زودرس فولیکول‌ها

* **مواد و روش‌ها:** به منظور القای PCO، به موش‌های صحرایی ماده نابالغ روزانه تستوسترون پروپونات را به مدت یک الی چهار هفته تزریق کردیم و گروه‌های کنترل تنها با حلال تزریق شدند. سپس تخمدان‌ها، مورد بررسی بافت‌شناسی، آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی و نقش پروتئین ترشح یافته شبه فریزلد نوع ۴ (sFRP4; Secreted Frizzled Related Protein-4) و پروتئین تنظیم‌کننده استروئیدوزن (Steroidogenic Acute Regulatory; StAR) و آنالیز آپوتوزیس قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** تیمار چهار هفته‌ای با تستوسترون موجب افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های بدوی، و کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های پیش‌آنترال و آنترال در مقایسه با تیمار یک هفته‌ای شده است. تغییرات مشاهده شده در تعداد فولیکول‌ها، همراه با افزایش معنی‌دار بیان sFRP4 در فولیکول‌های بدوی، اولیه و پیش‌آنترال در مقایسه با گروه‌های تیمار یک هفته‌ای و کنترل است. علاوه بر این، هم‌مکانی بالقوه‌ای بین بیان sFRP4 و آپوتوزیس در سطح سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌ها دیده شد. افزایش بیان StAR در لایه تک فولیکول‌ها و استرومای تیمار چهار هفته‌ای نسبت به تیمار یک هفته‌ای و گروه‌های کنترل مشاهده شد که هم‌مکان با بیان sFRP4 بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج ما نشانگر ارتباط بسیار معنی‌داری بین بیان sFRP4 و آپوتوزیس در نمونه‌های تیمار شده چهار هفته‌ای می‌باشد. هم‌مکانی StAR با sFRP4 می‌تواند نشانگر نقش sFRP4 در تمایز زودرس فولیکول‌ها باشد.

* **کلیدواژگان:** تخمدان پلی کیستیک، sFRP4، آپوتوزیس، StAR، سیگنال‌دهی Wnt

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۴، زمستان ۸۷، صفحات: ۲۴۹-۲۴۷

مقدمه

دارد (۹-۷). عملکرد مولکولی سیگنال‌دهی Wnt در تخمدان به طور واضحی مشخص نشده است، با این حال نقش Wnt-4 به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی سنتز تستوسترون در بیضه و کورتکس آدرنال گزارش شده (۱۰)، که نشانگر دخالت گلیکوپروتئین‌های Wnt در استروئیدوزن تخمدانی است. به علاوه در نتایج به دست آمده از تعیین شرح حال بیان ژنی ثابت شده، که بیان آنتاگونیست‌های Wnt شامل sFRP4، DKK1 و نیز بیان پروتئین Wnt-5A در سلول‌های تکا افراد مبتلا به OCP افزایش یافته است (۲) به همین دلیل مسیر سیگنال‌دهی Wnt در سلول‌های تکا و یا گرانولوزای این افراد دچار اختلال می‌شود که می‌تواند در ایجاد فنوتیپ تخمدان پلی کیستیک دخیل باشد. لذا بررسی مسیر سیگنال‌دهی Wnt و اثرات آن روی عملکرد طبیعی تخمدان، ما را در شناسایی مکانیسم بیوشیمیایی و مولکولی سندرم تخمدان پلی کیستیک یاری خواهد کرد.

در این مطالعه با استفاده از مدل تخمدان پلی کیستیک موش صحرایی (۱۱)، ارتباط میان بیان sFRP4 با آپوتوزیس در مراحل مختلف تکوین فولیکولی بررسی شد. روند لوتینیزیشن و افزایش استروئیدوزن، وابسته به بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلفی است که افزایش بیان پروتئین تنظیم‌کننده دقیق استروئیدوزن (Steroidogenic Acute Regulatory; StAR) نقش مهمی

سندرم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovarian Syndrome; PCOS) یکی از شایع‌ترین علل نازایی (۱۰-۵ درصد) در زنان به شمار می‌رود که با غلظت بالای پلاسمایی آندروژن‌ها، توقف رشد فولیکولی، لوتینیزیشن زودرس، عدم تخمک‌گذاری و اختلالات استروئیدوزن و آندوکراین همراه است (۱). از جمله مهم‌ترین مسیرهای سیگنال‌دهی که در اعمال طبیعی تخمدان بالغ نقش دارد مسیر سیگنال‌دهی Wnt است. یافته‌های حاصل از تعیین شرح حال بیان ژنی (Gene Expression Profiling) در تخمدان زنان مبتلا به PCOS نشانگر اختلال مسیر سیگنال‌دهی Wnt در این بیماران بوده است (۲). گلیکوپروتئین‌های Wnt، ملکول‌های ترشعی و سیگنال‌ده خارج سلولی هستند که به طور موضعی در تنظیم فرایندهای متنوع تکوینی نظیر تعیین قطبیت و سرنوشت سلولی، تکثیر و تمایز سلولی و دخالت در الگوسازی بافتی عمل می‌کنند. بیان پروتئین‌های Wnt در تکوین جنینی تخمدان (۳) و روند طبیعی رشد فولیکول‌ها در جوندگان گزارش شده است که در زمان و مکان مناسب توسط آنتاگونیست‌هایش کنترل می‌شود (۴، ۵). پروتئین ترشح یافته شبه فریزلد نوع ۴ (sFRP4; Secreted Frizzled Related Protein-4) به عنوان یکی از آنتاگونیست‌های مولکول‌های Wnt، در تشکیل جسم زرد (۶) و شروع آپوتوزیس در تخمدان جوندگان دخالت

Deltapix 450 و نرم‌فزار Deltapix viewer با بزرگ‌نمایی‌های ۵۰× تا ۶۳۵× انجام شد. فولیکول‌ها به ۶ دسته مجزا که شامل: فولیکول‌های بدوی (دارای یک لایه سنگفرشی سلول گرانولوزا و یا مخلوطی از سلول سنگفرشی و مکعبی به دور تخمک)، اولیه (دارای یک لایه سلول‌های گرانولوزا مکعبی به دور تخمک)، پیش‌آنترال (دارای چندین لایه سلول گرانولوزا با یک یا دو حفره کوچک)، آنترال (دارای یک حفره بزرگ)، کیستیک (دارای یک لایه نازک سلول‌های گرانولوزا)، لایه سلول‌های تکا (Theca) ضخیم شده و یک حفره بزرگ) و اجسام زرد تقسیم‌بندی شدند (۱۳، ۱۴). در هر برش به منظور جلوگیری از شمارش تکراری یک فولیکول، فقط فولیکول‌های دارای هسته واضح در تخمک شمارش شد. شمارش فولیکول‌های بدوی و اولیه با بزرگ‌نمایی ۶۳۰× با Immersion Oil انجام شد. برای شمارش فولیکول‌های پیش‌آنترال، آنترال، کیستیک و جسم زرد از بزرگ‌نمایی ۵× و یا ۱۰× استفاده شد و تعداد کل آنها بر مبنای آنچه شمارش شده بود محاسبه شد (۱۳، ۱۵، ۱۶).

آنالیز ایمنو‌هیستوشیمیایی

تخمندان موش‌های صحرایی، تثبیت، قالب‌گیری و برش‌گیری شدند. سپس برش‌های بافتی، پارافین‌زدایی و آب‌دهی شدند. به منظور بازیابی آنتی‌ژنی، برش‌های بافتی در بافر سترات ۱۰ میلی‌مولار با pH=۶ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. حذف مکان‌های اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه با قرار دادن برش‌ها در آلومین سرم گاوی (BSA) ۴ درصد تهیه شده از شرکت سیگما در PBS به مدت ۱ ساعت در دمای معمولی اتاق انجام شد. سپس نمونه‌ها با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش آنتی sFRP4 (اهدایی از طرف پروفیسور فریز) یا با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش آنتی StAR (خریداری شده از شرکت AbCam, u.k هر دو با رقت (۱:۱۰۰) رقیق شده در (۴ درصد) PBS+BSA به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق مرطوب انکوبه شدند. در کنترل منفی، برش‌ها فقط با محلول (۴ درصد) PBS+BSA در غیاب آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. سپس لام‌ها ۳ بار در PBS شسته شدند و به منظور مهار فعالیت پراکسیدهای آندوزن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای معمولی اتاق با هیدروژن پراکسید ۰/۳ درصد در متانول انکوبه شدند. لام‌ها پس از شست‌وشو با آنتی‌بادی ثانویه، آنتی IgG خرگوش بیوتینیل‌شده به مدت ۱ ساعت در دمای معمولی اتاق در اتاق مرطوب انکوبه شدند. بعد از این مرحله، انکوباسیون با Vectastain ABCComplex به مدت ۳۰ دقیقه در دمای معمولی اتاق انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در PBS شسته شدند و آشکارسازی با استفاده از نشانگر دی‌آمینوبنزیدین (DAB)، که یک رسوب قهوه‌ای ایجاد می‌کند، انجام گرفت. و سرانجام آنالیز برش‌ها با میکروسکوپ نوری معمولی انجام شد.

آنالیز آپوپتوزیس به روش TUNEL

ابتدا برش‌های بافتی، پارافین‌زدایی و آب‌دهی شدند، بازیابی آنتی‌ژنی به وسیله تیمار برش‌های بافتی با بافر سترات ۱۰ میلی‌مولار با pH=۶ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مکان‌های غیراختصاصی اتصال آنزیم، با انکوباسیون برش‌ها به مدت یک ساعت در محلول PBS حاوی ۴ درصد BSA در دمای معمولی اتاق، حذف شدند. بعد از این مرحله برش‌ها دو بار در PBS شسته شدند. سپس برش‌ها با مخلوط واکنش TUNEL با آنزیم Tdt به مدت

را در این روند ایفا می‌کند (۱۲). یکی از مشخصات بارز تخمدان پلی‌کیستیک افزایش استروئیدوزن سلول‌های تک داخلی و وقوع لوتینی‌زیشن زودرس (یا تمایز زودرس فولیکولی) است (۲). با توجه به افزایش بیان sFRP4 در روند لوتینی‌زیشن، بیان پروتئین StAR و هم‌مکانی آن با بیان sFRP4 نیز بررسی شده است، تا نقش sFRP4 در تخمدان پلی‌کیستیک آشکار شود.

مواد و روش‌ها

آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش آنتی sFRP4 اهدایی از طرف پروفیسور فریز از دانشگاه برن سوئیس، آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش آنتی StAR خریداری شده از شرکت (Ab-Cam, UK)، کیت TUNEL از شرکت (Roche F-Hoffman La) Poly-lysine propidium iodide، کیت BSA از شرکت (Sigma-Aldriche)، کیت Vectashield، Vectastain و نشانگر دی‌آمینوبنزیدین (DAB) از شرکت UK، Vector laboratories خریداری شد.

روش‌ها

تیمار حیوانات

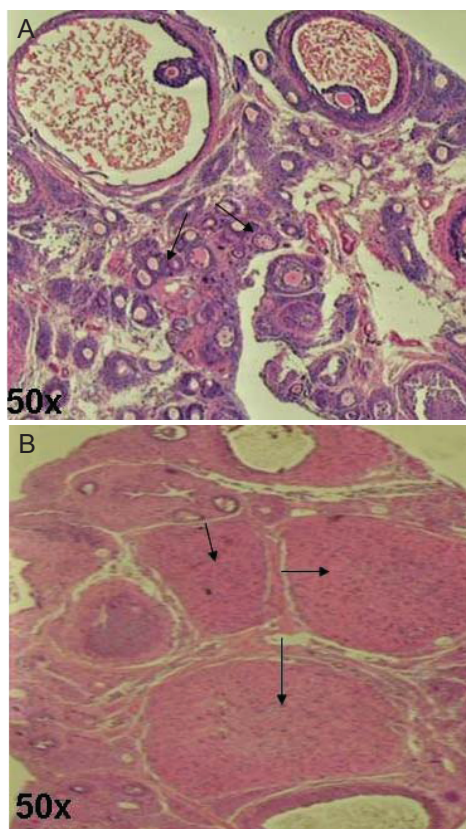
موش‌های صحرایی ماده نابالغ از نژاد Wistar با وزن ۵۰-۴۰ گرم از حیوانخانه دانشکده بهداشت دانشگاه تهران برای انجام آزمایش‌ها تهیه شدند. موش‌های صحرایی در شرایط ۲۱ ساعت روشنایی و ۲۱ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری شدند و آزمایش‌ها از تیر ماه ۸۵ تا شهریور ماه ۸۶ در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه تهران صورت گرفته است. این طرح مصوبه کمیته اخلاق دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران می‌باشد.

سه سری آزمایش مستقل طراحی شد و در هر سری هشت موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت که به دو گروه چهارتایی تیمار شده و کنترل تقسیم شدند. گروه تیمار روزانه با تزریق زیرجلدی تستوسترون پروپیونات (TP) حل شده در روغن کنجد به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدنشان به مدت یک الی چهار هفته تیمار شدند، و به گروه کنترل در طی این مدت روغن کنجد تزریق شد. در پایان تیمار از هر گروه ۴ حیوان در هر سری کشته شدند. یک تخمدان هر موش صحرایی در پارافمالدئید ۴ درصد تثبیت شد و سپس نمونه‌های بافتی با پارافین قالب‌گیری و توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۷ میکرومتر برش‌گیری شدند. سپس برش‌های پیاپی پارافینی برای شمارش فولیکولی، آنالیز ایمنو‌هیستوشیمیایی و آپوپتوزیس (به روش TUNEL) مورد بررسی قرار گرفتند.

شمارش فولیکولی

در این مطالعه چهار نمونه تیمار (۱ هفته/۴ هفته) و چهار نمونه کنترل (۱ هفته/۴ هفته) در هر سری از آزمایش‌ها وجود داشت. از آنجایی که این تحقیق در ۳ نوبت مجزا انجام پذیرفت لذا مجموعاً در هر یک از گروه‌های تیمار و کنترل ۱۲ نمونه برای آنالیزهای مورد نظر از جمله شمارش فولیکولی داشتیم. شمارش فولیکولی روی برش‌های رنگ‌آمیزی شده با همتاکسیلین-اوتوزین توسط میکروسکوپ Zeiss axiophot و دوربین دیجیتال (Denmark)

فولیکول‌های بدوی به صورت معنی‌داری ($p < 0.001$) در حیوانات تیمار شده با تستوسترون در مقایسه با کنترل و تیمار یک هفته‌ای افزایش یافته است. در حالی که تعداد فولیکول‌های پیش آنترال و آنترال به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) در مقایسه با کنترل و تیمار یک هفته‌ای کاهش یافته است.



شکل ۱: آنالیز ریخت‌شناسی تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با تستوسترون پروپیونات و کنترل
A: برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-اوتوزین فولیکول‌های کیستیک بزرگ و فلش‌ها تعداد زیادی فولیکول‌های پیش آنترال را نشان می‌دهند ($\times 50$).
B: فلش‌ها در تخمدان گروه کنترل موش‌های صحرایی بالغ اجسام زرد را مشخص می‌کنند.

به منظور بررسی بیان sFRP4 و هم‌مکانی آن با StAR و آپوپتوزیس در بخش‌های مختلف تخمدان (استروما-سلول‌های گرانولوزا و یا تکا)، آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی و TUNEL بر روی برش‌های یبایی تخمدان تیمار شده و کنترل انجام شد (شکل ۲). آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده یک هفته ای نشانگر بیان ضعیف سیتوپلاسمیک sFRP4 و StAR و هم‌مکانی این دو پروتئین در سطح استروما، لایه تکا و سلول‌های گرانولوزا به طرف حفره آنتروم در فولیکول‌های کیستیک است (شکل B و A). در حالی که تیمار طولانی مدت با TP موجب افزایش بیان sFRP4 و StAR در دستجات مختلف فولیکولی (در برگیرنده فولیکول‌های بدوی تا آنترال) می‌شود (شکل E و D).

هم‌مکانی و بیان سیتوپلاسمیک sFRP4 و StAR در سلول‌های گرانولوزای رو به حفره آنتروم نشان داده شده است (شکل L, K).

۲ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتاق تاریک و مرطوب انکوبه شدند. در کنترل منفی، برش‌ها با مخلوط واکنش TUNEL بدون آنزیم انکوبه شدند. بعد از آنکوباسیون، نمونه‌ها ۳ بار در PBS شسته شدند و رنگ‌آمیزی هسته‌ها با Propidium Iodide (۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتاق تاریک و مرطوب صورت گرفت و سپس لام‌ها در PBS شسته شدند. در مرحله بعد بر روی نمونه‌ها محلول vectashield قرار گرفت و برای آنالیز آپوپتوزیس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. پس از این مرحله به منظور بررسی دقیق‌تر نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری به شرح زیر عمل شد. لام‌ها به منظور پاک شدن چسب Vectashield در PBS به خوبی شسته و به مدت ۳۰ دقیقه تا یک ساعت توسط ۴ درصد BSA انکوبه و بعد ۳ بار در PBS شسته شدند. در این مرحله نمونه‌ها با آنتی‌بادی آنتی‌فلورسین مزدوج شده با پراکسید که به نوکلئوتیدهای فلورسین چسبیده به انتهای ۳-OH آزاد DNAهای قطعه‌قطعه متصل می‌شوند و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها در PBS شسته و آشکارسازی با استفاده از نشانگر DAB، که یک رسوب قهوه‌ای ایجاد می‌کند، انجام شد. نمونه‌ها با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند و آب‌گیری و شفاف‌سازی با سری الکل‌ها و زایلین صورت گرفت. در پایان با استفاده از چسب انتالز لامل روی نمونه‌ها چسبیده و آنالیز برش‌ها زیر میکروسکوپ نوری معمولی دنبال شد.

آنالیز آماری

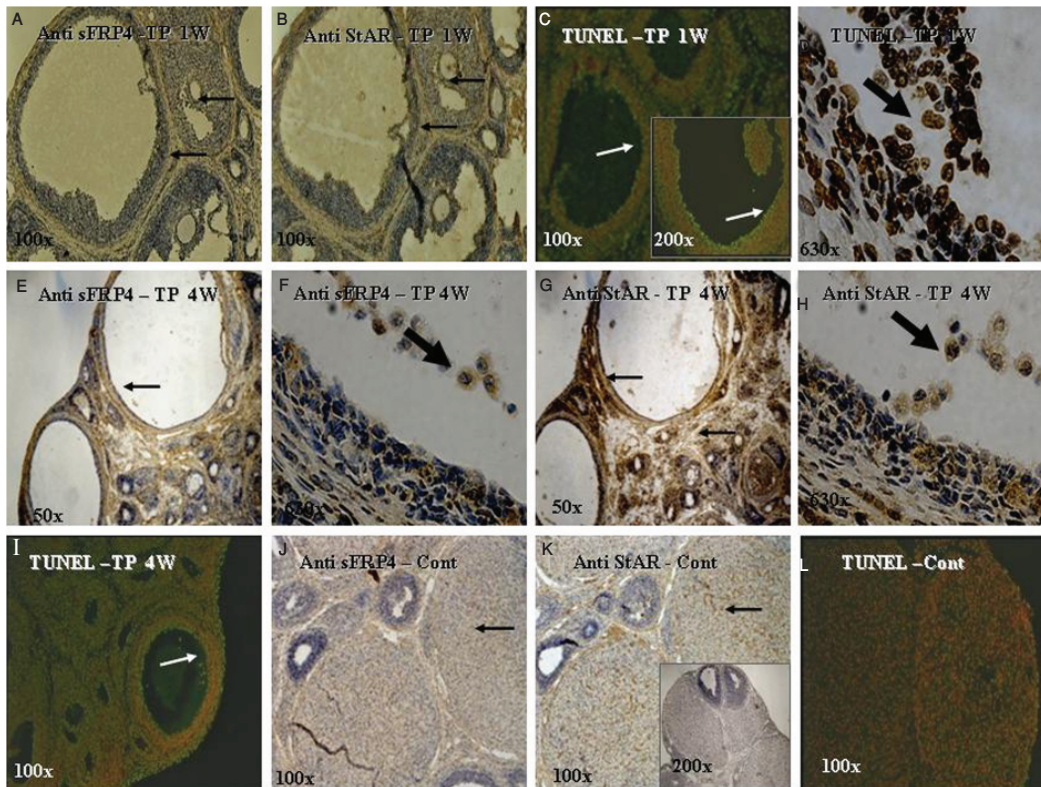
آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار INSTAT و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه انجام شد. $p \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه شده و نتایج به صورت (Mean \pm SD) انحراف از معیار \pm میانگین ($n=12$) نشان داده شده است.

یافته‌ها

یکی از مهمترین شاخص‌های تخمدان پلی‌کیستیک توقف رشد فولیکولی و مشاهده فولیکول‌های کیستیک در تخمدان است. مدل‌های بسیار متعددی برای ایجاد تخمدان پلی‌کیستیک در موش صحرایی گزارش شده است. مدل مورد استفاده در این مطالعه توسط بلوسسکی و همکارانش (۱۱) قبلاً گزارش شده که با تزریق روزانه تستوسترون پروپیونات به موش صحرایی ماده نابالغ قادر به ایجاد ویژگی‌های تخمدان پلی‌کیستیک در تخمدان همراه با اختلالات متابولیک شده‌اند. آنالیز بافت‌شناسی برش‌های تخمدانی نمونه‌های تیمار شده به وضوح وجود فولیکول‌های کیستیک و تجمع فولیکول‌های پیش آنترال، عدم تخمک‌گذاری و فقدان اجسام زرد را نشان داده‌اند (شکل ۱A). حال آنکه در نمونه‌های کنترل، وجود تعداد زیاد جسم زرد نشانگر سیکل جنسی نرمال است (شکل ۱B).

به منظور تعیین اثر تستوسترون بر روی تکوین فولیکولی، همان طوری که در بخش روش‌ها شرح داده شد، فولیکول‌ها بر اساس ریخت‌شناسی به ۶ گروه دسته‌بندی شدند که عبارتند از: ۱. فولیکول‌های بدوی، ۲. فولیکول‌های اولیه، ۳. فولیکول‌های پیش آنترال، ۴. فولیکول‌های آنترال، ۵. فولیکول‌های کیستیک و ۶. اجسام زرد.

با توجه به نمودار ۱، اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین گروه‌های تیمار شده و کنترل در هفته اول تیمار و در هیچ کدام از دستجات فولیکولی دیده نشده است. با ادامه تیمار در هفته چهارم تعداد



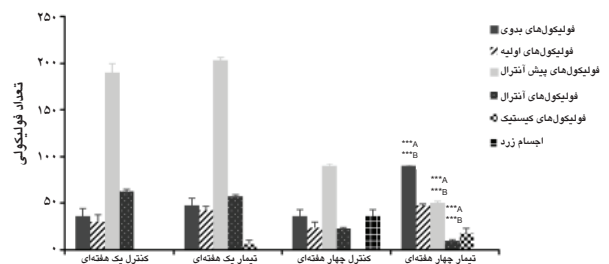
شکل ۲: بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان sFRP4 و StAR و آنالیز TUNEL در موش‌های صحرایی تیمار شده با تستوسترون پروپیونات و کنترل بزرگ‌نمایی کوچک از برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی آنتی sFRP4 (A, E, J)؛ فلش‌ها بیان sFRP4 در لایه تکا و سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های لوتئال جسم زرد را به ترتیب نشان می‌دهند. بزرگ‌نمایی کوچک از برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی آنتی StAR (B, G, K)؛ فلش‌ها بیان StAR در لایه تکا، سلول‌های گرانولوزا، استروما و سلول‌های لوتئال جسم زرد را به ترتیب نشان می‌دهند. بزرگ‌نمایی بالا مکان سینتوپلاسمیک بیان sFRP4 در سلول‌های گرانولوزا رو به آنتروم در شکل (F) هم‌مکان با بیان StAR در شکل (H) را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی TUNEL به روش فلورسنت (C, I, L) سلول‌های گرانولوزای رو به آنتروم، لایه تکا، استروما و سلول‌های لوتئال به ترتیب نشان داده شده است. شکل ضمیمه C سلول‌های گرانولوزای آپوپتوتیک رو به حفره آنتروم را با بزرگ‌نمایی بالاتر نشان می‌دهد. به منظور بررسی دقیق‌تر آپپتوز نشان (D) نشان دهنده آنالیز TUNEL با استفاده از نشانگر DAB است که سلول‌های رو به آنتروم در کیست را نشان می‌دهد. شکل ضمیمه (K) کنترل منفی آنالیز ایمونوهیستوشیمی را در غیاب آنتی‌بادی اولیه نشان می‌دهد. (TP = تیمار شده با تستوسترون پروپیونات، Cont = کنترل، 1W = 1 یک و 4W = چهار هفته‌ای).

صورت گرفت.

در تیمار طولانی مدت موش‌های صحرایی با TP، وابستگی و هم مکانی معنی‌دار و بالقوه‌ای بین بیان sFRP4 و آپپتوزیس در تمامی دستجات فولیکولی مشاهده شده است (شکل H و B).

علاوه بر آنالیز TUNEL به روش فلورسانس از نشانگر DAB به منظور مشاهده دقیق‌تر نیز استفاده شده است (شکل ۲G). آپپتوزیس سلول‌های گرانولوزا رو به حفره آنتروم به وضوح در شکل ۲G نمایان است. در این شکل هسته سلول‌ها به شدت قهوه‌ای هستند که نشانگر وجود DNA قطعه قطعه شده است.

وابستگی بین بیان sFRP4 و آپپتوزیس در نمودار ۲ و ۳ نشان داده شده است. نمودار ۲ نشانگر درصد بیان sFRP4 و نمودار ۳ نشانگر درصد آپپتوزیس در دسته‌های مختلف فولیکولی است. در تیمار یک هفته‌ای، بیان sFRP4 در فولیکول‌های پیش آنترال (۴۰ درصد)، آنترال (۶۵ درصد) و کیستیک (۱۰۰ درصد) دیده شد (نمودار ۲) که منطبق با نتایج به دست آمده برای درصد آپپتوزیس در فولیکول‌های پیش آنترال (۶۶ درصد)، آنترال (۸۲ درصد) و کیستیک (۱۰۰ درصد) بوده است (نمودار ۳). در حالی که در گروه تیمار چهار هفته‌ای، بیان بالای

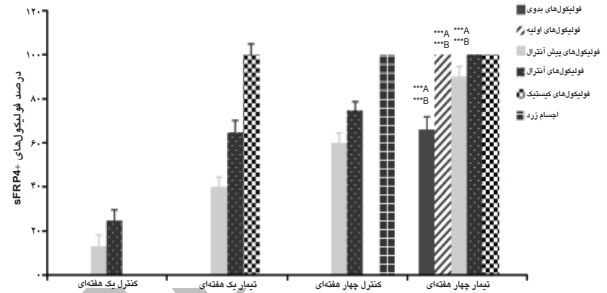


نمودار ۱: شمارش دستجات فولیکولی در تخمدان پلی‌کیستیک و تخمدان کنترل نرمال

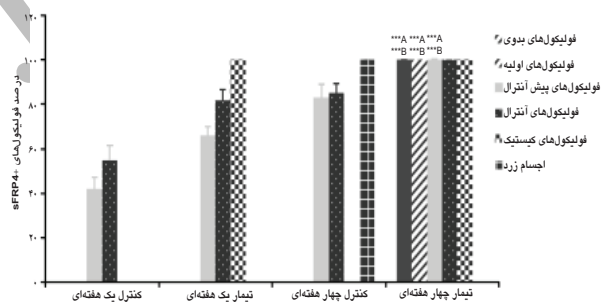
تعداد کل فولیکول‌ها در هر کدام از دستجات فولیکولی در پایان هفته‌های اول و چهارم، در حیوانات تیمار شده و کنترل شمارش شده است. نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار نشان داده شده است. $n=12$ و $P < 0.001$. تعداد فولیکول‌های بدوی، پیش آنترال و آنترال در تیمار چهار هفته‌ای (D) نسبت به تیمار (B) و کنترل (A) یک هفته‌ای اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. A. کنترل یک هفته‌ای، B. تیمار یک هفته‌ای، C. کنترل چهار هفته‌ای، D. تیمار چهار هفته‌ای.

با توجه به نقش پروآپوپتوتیک تستوسترون در تخمدان جوانان و پرمات‌ها (۱۷، ۱۸)، آنالیز TUNEL بر روی برش‌های تخمدانی

sFRP4 نه تنها در فولیکول‌های پیش آنترال (۹۰ درصد)، آنترال (۱۰۰ درصد) و کیستیک (۱۰۰ درصد) بلکه در فولیکول‌های بدوی (۶۶ درصد) و اولیه (۱۰۰ درصد) نیز دیده شده است (نمودار ۲) که همراه با آپوتوزیس ۱۰۰ درصد در تمامی دستجات فولیکولی بوده است (نمودار ۳).



نمودار ۲: درصد بیان sFRP4 در دستجات مختلف فولیکولی تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با TP و کنترل. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $n=12$ و $p \leq 0.001$. تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پیش آنترال در تیمار چهار هفته‌ای (D) نسبت به تیمار (B) و کنترل (A) یک هفته‌ای اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. A. کنترل یک هفته‌ای، B. تیمار یک هفته‌ای، C. کنترل چهار هفته‌ای، D. تیمار چهار هفته‌ای.



نمودار ۳: درصد آپوتوزیس در دستجات مختلف فولیکولی تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با TP و کنترل. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. $n=12$ و $p \leq 0.001$. تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و پیش آنترال در تیمار چهار هفته‌ای (D) نسبت به تیمار (B) و کنترل (A) یک هفته‌ای اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. A. کنترل یک هفته‌ای، B. تیمار یک هفته‌ای، C. کنترل چهار هفته‌ای، D. تیمار چهار هفته‌ای.

آنالیز ایمنونوهیستوشیمیایی تخمدان‌های کنترل نشانگر بیان sFRP4 هم مکان با آپوتوزیس در اجسام زرد و فولیکول‌های پیش آنترال و آنترال بود (شکل ۱ و ۲C). بیان ضعیف StAR نیز عمدتاً در اجسام زرد مشاهده شد (شکل ۲F). در گروه کنترل یک هفته‌ای بیان sFRP4 فقط در فولیکول‌های پیش آنترال (۳۱ درصد) و آنترال (۲۵ درصد) دیده شد (نمودار ۲) و آپوتوزیس نیز صرفاً در فولیکول‌های پیش آنترال (۴۲ درصد) و آنترال (۵۵ درصد) مشاهده شد (نمودار ۳). در گروه کنترل چهار هفته‌ای که دارای سیکل جنسی مرتب هستند، بیان sFRP4 در فولیکول‌های پیش آنترال (۶۰ درصد)، آنترال (۷۵ درصد) و اجسام زرد (۱۰۰ درصد) وجود داشت (نمودار ۲) که درصد بالای آپوتوزیس ۸۳ درصد، ۸۵ درصد، و ۱۰۰ درصد در فولیکول‌های پیش آنترال، آنترال و اجسام زرد به ترتیب دیده شد (نمودار ۳).

بحث

افزایش بیان sFRP4 در تعیین شرح حال بیان ژنی سلول‌های تک جدا شده از بافت تخمدان پلی‌کیستیک انسانی گزارش شده است (۲)، ولیکن نقش و مکان بیان آن در دیگر قسمت‌های تخمدان تا کنون مشخص نشده است. در این مطالعه برای اولین بار نقش و مکان بیان sFRP4 در مدل تخمدان پلی‌کیستیک موش صحرایی القا شده با تستوسترون پروپونات بررسی شده است. در این گزارش افزایش بیان sFRP4 در تیمار طولانی مدت با تستوسترون نشان داده شده است. مطالعات متعددی، نقش آن‌درژن‌ها را در شروع رشد و تکوین فولیکولی گزارش داده اند (۱۸، ۱۹)، چنانچه در موش‌های فاقد رسیپتور آن‌درژن هر چه سنشان بالاتر می‌رود، ذخیره فولیکولی تخمدان کمتر می‌شود و دچار از کار افتادگی زودرس تخمدان می‌شوند (۲۰). در تایید این گزارش‌ها، آزمایش‌های ما نیز نشانگر افزایش ذخیره فولیکولی بر اثر تیمار دراز مدت با تستوسترون است. لازم به ذکر است که تستوسترون به عنوان عامل پیش‌برنده آپوتوزیس نیز در تخمدان موش صحرایی گزارش شده است (۲۱). در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های در حال رشد در تیمار دراز مدت و درصد بالای آپوتوزیس در فولیکول‌های بدوی و اولیه می‌تواند از یک طرف نشانگر توقف رشد فولیکولی و از طرف دیگر بیانگر تجمع ذخیره فولیکولی باشد. در بافت تخمدان پلی‌کیستیک انسان نیز تجمع فولیکول‌های بدوی تا اولیه گزارش شده است که علت آنرا کاهش رشد فولیکولی دانسته‌اند (۲۲).

وجود رسیپتور آن‌درژن در استروما، در سلول‌های گرانولوزا به طرف حفره آنتروم و در کومولوس اوفوروس فولیکول‌های آنترال موش صحرایی گزارش شده است (۱۹). در مشاهدات ما نیز بیان sFRP4 در سلول‌های گرانولوزا به طرف آنتروم فولیکول‌های آنترال و کیستیک و همچنین در کومولوس اوفوروس فولیکول‌های آنترال دیده شده است که می‌تواند نشانگر تنظیم بیان sFRP4 توسط آن‌درژن‌ها باشد.

در این مطالعه مشخص شد که آپوتوزیس فولیکول‌ها در تمامی مراحل تکوین و رشد در تیمار دراز مدت با تستوسترون به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و افزایش بیان sFRP4، وابسته به رویدادهای آپوتوتیک است. بیان sFRP4 در سلول‌های گرانولوزا و کومولوس اوفوروس و اوسیت هم‌مکان با آپوتوزیس بوده است، ولیکن هم‌مکانی آپوتوزیس و بیان sFRP4 در لایه سلول‌های تک به طور پراکنده دیده شده است که می‌تواند نشانگر نقش این پروتئین در اختلال مسیر سیگنال‌دهی Wnt در این قسمت فولیکول باشد. اگر چه sFRP4ها به عنوان آنتاگونیست مسیر سیگنال‌دهی Wnt شناخته شده‌اند، اما تاکنون قابلیت مهار این مسیر سیگنال‌دهی توسط sFRP4 گزارش نشده است. مطالعات جدید، اثرات مختلفی را برای sFRP4 ارائه داده‌اند. در بعضی از سرطان‌ها sFRP4 اثر آنتی آپوتوتیک و در برخی دیگر بیان آن منجر به آپوتوزیس سلول‌ها شده است (۸، ۹). بنابراین اختلال مسیر سیگنال‌دهی Wnt در مدل تخمدان پلی‌کیستیک به علت افزایش بیان sFRP4 نیاز به بررسی بیان دیگر مولکول‌های دخیل در این مسیر سیگنال‌دهی دارد.

هایپرآن‌درژنی در PCOS منجر به تمایز زودرس و توقف رشد فولیکولی می‌شود (۱۱). اثر تستوسترون نیز در افزایش بیان رسیپتورهای

اثر آن در مطالعات *in vitro* و یا *in vivo* می‌تواند به درک بهتر نقش آن در اختلال مسیر سیگنال‌دهی Wnt و ایجاد فنوتیپ PCO کمک کند.

تقدیر و تشکر

از کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری سرکار خانم لادن دلفی به خاطر راهنمایی‌هایشان، خانم دکتر آمنه رضایوف برای کمک در آنالیز آماری، پروفیسور R.Friis در گروه پژوهش بالینی دانشگاه برن-سوییس برای اهداء آنتی‌بادی آنتی sFRP4، دکتر A.de Agostini در دانشگاه ژنو کلینیک نازایی بیمارستان دانشگاهی ژنو و پروفیسور P.Bischof برای راهنمایی‌های علمی نهایت تشکر را داریم. این طرح به شماره ۲۶۸۳۰۸/۱/۰۱ با کمک هزینه مالی دانشگاه تهران-پردیس علوم انجام یافته است.

References

1. Legro RS. Polycystic ovarian syndrome. In: Adashi A Leung P (eds). The Ovary. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 2004; 489-512.
2. Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss III JF. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. J Reprod Immunol. 2004; 63: 51-60.
3. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature. 1999; 397: 405-409.
4. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. Endocrinology. 2002; 143: 898-908.
5. Ricken A, Lochhead P, Kontogiannea M, Farookhi R. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. Endocrinology. 2002; 143: 2741-2749.
6. Hsieh M, Mulders SM, Friis RR, Dharmarajan AM, Richards JS. Expression and localization of secreted Frizzled-Related Protein-4 in the rodent Ovary: Evidence for selective up-Regulation in luteinized granulosa Cells. Endocrinology. 2003; 144: 4597-4606.
7. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S, et al. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. Biol. Reprod. 1998; 58: 739-746.
8. Wolf V, Ke G, Dharmarajan AM, Bielke W, Artuso L, Saurer S, Friis R. DDC-4, an apoptosis associated gene, is a secreted frizzled relative. FEBS Lett. 1997; 17; 417(3): 385-389.
9. Drake JM, Friis RR, Dharmarajan A. The role of sFRP-4, a secreted frizzled- related protein, in ovulation. Apoptosis. 2003; 8: 389-397.
10. Heikkila M, Prunskaitė R. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. Endocrinology. 2005; 146: 4016-4023.
11. Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dan-

tes A, Land-Bracha A, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. Int J Mol Med. 2004; 14: 207-215.

12. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Luteinization hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86: 1318-1326.

13. Meyers M, Britt K L. Methods for quantifying follicular number within the mouse ovary. Reproduction. 2004; 127: 569-580.

14. Meredith S, Dudenhoeffer G, Jackson K. Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. J Reprod Fertil. 2000; 119: 43-48.

15. Hirshfield AN, Midgley AR. Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol Reprod. 1978; 19: 597-605.

16. Tilly J. Ovarian follicle counts- not as simple as 1, 2, 3. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1: 11.

17. Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. Hum Reprod. 1997; 12: 107-111.

18. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ and Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. J Clin Invest 1998; 101: 2622-2629.

19. Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. J Biology Reprod Fertil. 1998; 113: 27-33.

20. Shiina H, Matsumoto T. Premature ovarian failure in androgen receptor deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 3: 224-229.

21. Billig H, Furutua I, Hsueh AJW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology. 1993; 133: 2204-2212.

22. Maciel Gustavo AR, Baracat E, Benda J. Stockpiling of transitional and classic primary follicles. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 89(11): 5321-5327.

23. Richards JS, Russel DL, Ochsner S, Hsieh M,

نتیجه‌گیری

بیان افزایش یافته sFRP4 با تستوسترون علاوه بر وابستگی به رویدادهای آپوپتوتیک در سلول‌های گرانولوزا می‌تواند نقش جدید و ناشناخته‌ای در تنظیم فعالیت استروئیدوژنیک سلول‌های تک در PCO ایفا کند. استفاده از پروتئین نو ترکیب sFRP4 و بررسی

Doyle K, Fallender A.E. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 195-220.
24. Hsieh M, Boerboom D, Shimada M, Lo Y, Parlow

A, Luhmann U, Berger W, Richards JS. Mice null for *Frizzled4* (*Fzd4*^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol. Reprod.* 2005; 73: 1135-1146.

Archive of SID