

## **Expression of GSK-3 $\beta$ and $\beta$ - Catenin Proteins in the PMSG Stimulated Rat Ovary**

**Mirakhori F., M.Sc., Zeynali B., Ph.D.\* , Parvaneh Tafreshi A., Ph.D.**

*\* P.O.BOX: 14155-6455, Developmental Biology Department, School of Biology ,University College of Science, Tehran University, Tehran, Iran*

### **Abstract**

**Purpose:** The ovary is an example of a developing tissue in which developmental processes occur throughout reproductive life. We investigate the expression of GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin- Wnt pathway molecules- in the rat ovary during follicular development.

**Materials and Methods:** To induce follicular growth and development, 23 days old immature female rats were injected with 10 IU of PMSG. Forty and forty-eight hours after stimulation with PMSG, the sera was collected for hormone assay, and the ovary were dissected and prepared for immunohistochemistry(IHC)and western blot(WB).

**Results :** Our IHC and WB analysis showed that the expression of pGSK-3 $\beta$  and active  $\beta$ -catenin was increased in PMSG primed rats in compared to those of intact groups. However, the total GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin proteins remain unchanged.

**Conclusion:** The results indicate this idea that gonadotropin (PMSG), stabilized  $\beta$ -catenin in GSK-3 $\beta$  independent manner in the rat ovary during the follicular development.

**Key words:** GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, Ovarian follicular development, Rat

## بررسی بیان پروتئین‌های GSK-3 $\beta$ و بتا کتینین در تخمدان موش‌های صحرایی نابالغ تحریک شده با PMSG

فهیمه میرآخوری\* M.Sc.، بهمن زینلی\* Ph.D.، آزیتا پروانه تفرشی\*\* Ph.D.

\* دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران

\*\* گروه بیوشیمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ وصول: تیرماه ۸۸، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۸

### چکیده

**هدف:** تخمدان از جمله بافت‌های بالغی است که روند تکوین در آن در تمام طول دوره تولید مثلی به وقوع می‌پیوندد. در این بررسی، بیان پروتئین‌های GSK-3 $\beta$  و بتا کتینین، از مولکول‌های مسیر سیگنال‌دهی Wnt، در تخمدان موش‌های صحرایی در طول تکوین فولیکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** برای تحریک تکوین فولیکولی ۱۰IU PMSG، به موش‌های ماده ۲۳ روزه (نابالغ)، به صورت درون صفاقی تزریق شد و بعد از ۴۰ و ۴۸ ساعت، سرم خون به منظور سنجش هورمونی جمع‌آوری شد و تخمدان‌ها تشریح و آماده بررسی‌های ایمنو هیستوشیمی (IHC) و وسترن بلات (WB) شدند.

**یافته‌ها:** نتایج IHC، WB نشان داد که الگوی بیان GSK-3 $\beta$  فسفوریله و بتا کتینین فعال در موش‌هایی که PMSG دریافت کرده‌اند، نسبت به گروه دست نخورده افزایش می‌یابد. در حالی که میزان کل پروتئین‌های GSK-3 $\beta$  و بتا کتینین تقریباً بدون تغییر باقی می‌مانند. **نتیجه‌گیری:** از نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که گنادوتروپین (PMSG) در طول تکوین فولیکولی در تخمدان موش‌های صحرایی موجب پایداری بتا کتینین شده که این امر مستقل از تغییرات GSK-3 $\beta$  است.

**کلیدواژه‌ها:** GSK-3 $\beta$ ، بتا کتینین، تکوین فولیکول‌های تخمدان، موش صحرایی

### مقدمه

ژن‌های Wnt (برگرفته از ژن Wingless در دروزوفیلیا و Integrated در مهره‌داران) کدکننده خانواده گلیکوپروتئین‌های ترشحی هستند که با اتصال به رسپتور سطح غشایی خود موجب راه‌اندازی آبشار داخل سلولی، به نام مسیر سیگنال‌دهی Wnt (Wnt signaling pathway) می‌شود [۱]. این مسیر در تنظیم بسیاری از مکانیسم‌های تکوینی از جمله تمایز، مهاجرت سلولی، تنظیم تکثیر سلولی و بسیاری از مکانیسم‌های سلولی - تکوینی دیگر نقش ایفا می‌کند. اتصال لیگاند Wnt به گیرنده Frizzled، موجب فعال‌سازی حداقل دو مسیر سیگنال‌دهی جداگانه به نام‌های مسیر وابسته به بتا کتینین یا مسیر اصلی Wnt (canonical) و مسیر مستقل از بتا کتینین (non-canonical) می‌شود. در مسیر اصلی، مهار آنزیم گلیکوژن سنتتاز کیناز ۳ (glycogen synthase kinase-3; GSK-3 $\beta$ ) منجر به پایداری بتا کتینین سیتوپلاسمی و انتقال آن به هسته سلول می‌شود.

در دروزوفیلیا و مهره‌داران، بتا کتینین، تکوین فولیکول‌های تخمدان، موش صحرایی

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه تکوین، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۵  
Email: bzeynali@Khayam.ut.ac.ir

الگوسازی بافتی در حشرات و مهره داران دخالت دارد. اما هنوز اطلاعاتی در مورد تغییرات بیان مولکول‌های پایین دست مسیر Wnt در تخمدان و طی تکوین فولیکولی وجود ندارد. بنابراین در پژوهش حاضر بیان پروتئین‌های GSK-3 $\beta$  و بتاکتین که از اعضای مهم مسیر Wnt هستند، بررسی شد. با استفاده از گنادوتروپین (PMSG) pregnant mare's serum (gonadotropin) تکوین فولیکولی را در تخمدان موش‌های صحرایی نابالغ تحریک و بیان پروتئینی GSK-3 $\beta$  و بتاکتین بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### آماده سازی نمونه

در این مطالعه رت‌های ماده ۲۳ روزه نابالغ نژاد Wistar (از انستیتو پاستور ایران) استفاده و حیوانات در شرایط استاندارد نور (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی)، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی پنج عدد بوده و هر آزمایش با حداقل سه بار تکرار انجام پذیرفت. گروه‌های مورد بررسی شامل گروه دست نخورده (بدون تزریق PMSG، به عنوان گروه کنترل) و گروه تجربی (با تزریق PMSG) بود. برای تحریک تکوین فولیکولی، موش‌های مورد آزمایش ۱۰IU PMSG به صورت درون صفاقی دریافت کردند. ۴۸ و ۴۰ ساعت بعد از تزریق PMSG، تخمدان‌ها خارج و یکی از آنها برای انجام بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شد و تخمدان دیگر برای وسترن بلات در ازت مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### هیستولوژی

۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG، تخمدان‌ها خارج و با محلول بوئن برای مطالعات بافت‌شناسی تثبیت شد. پس از مراحل

بتاکتین در هسته موجب بیان ژن‌های هدف Wnt می‌شود. در غیاب لیگاند Wnt، بتاکتین فسفوریل شده و در اختیار کمپلکس تخریبی درون سلولی قرار می‌گیرد [۱].

اعضای این مسیر علاوه بر دخالت در تکوین بافت‌های جنینی، در همئوستازی اکثر بافت‌های بالغ در پستانداران نیز دخالت دارند [۲ و ۳]. به طور مثال در سیستم تولید مثلی ماده، پروژسترون با کاهش GSK-3 $\beta$  موجب فعال شدن مسیر سیگنال دهی Wnt شده و استروژن با انتقال بتاکتین به هسته و ایجاد کمپلکس با عوامل رونویسی موجب بیان ژن‌های هدف مربوط می‌شود. همان‌طور که می‌دانید استروژن‌ها در رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولی و در نتیجه پیشبرد تکوین فولیکولی بسیار مؤثر هستند. این اطلاعات بیانگر اهمیت فعال‌سازی مسیر سیگنال دهی Wnt توسط عوامل اندوکرینی چون استروژن و پروژسترون در سیستم تولید مثلی ماده و تکوین فولیکول‌های تخمدانی است [۴]. اعضای خانواده پروتئینی Wnt علاوه بر نقش‌های ضروری در ارگانوژنز و تولید مثل در موش‌های ماده، برای تمایز و عملکرد سلول‌های تخمدانی نیز ضروری است. در مراحل مختلف تکوین فولیکولی، تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد الگوهای بیانی متفاوتی از ژن‌های کد کننده انواع Wnt در تخمدان مشاهده می‌شود [۳ و ۵]. بیان لیگاندها و رسپتورهای مختلف مسیر سیگنال دهی Wnt در مراحل مختلف تکوین فولیکولی در تخمدان چونندگان ثابت شده است که نشانگر عملکردهای متعدد و مهم این مسیر سیگنال دهی در تخمدان است [۶]. با توجه به شواهد موجود ذکر شده در بالا به نظر می‌رسد، مسیر Wnt و اعضای آن در تکوین و عملکرد سلول‌های تخمدانی نقش‌های مهمی را ایفا می‌کند ولی هنوز اطلاعات کافی در این زمینه وجود ندارد.

اعضای خانواده Wnt در روندهای تکوینی متعدد از قبیل تنظیم مهاجرت سلولی، تکثیر/ آپوپتوز سلولی، تمایز سلولی و

سانتی‌گراد قرار گرفت. برش‌ها سپس در محلول بلوک‌کننده (PBS) Phosphate Saline Buffer و (BSA) Bovine serum Albumin ۳ درصد به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشو با محلول PBS، برش‌ها با آنتی‌بادی اولیه  $\beta$ -GSK-3 (Sigma) phosphor & total (Santa cruz) active  $\beta$ -pan  $\beta$ -catenin (Up state) یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو با محلول PBS، به منظور مهار فعالیت پراکسیدهای آندوزن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای معمولی اتاق با هیدروژن پراکسیداز ۳ درصد در متانول انکوبه شد. سپس برش‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کیت LSAB (Dako) (labeled streptavidin biotin) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو، آشکار سازی با استفاده از نشانگر دی‌آمینوبنزوتید (DAB)، به مدت ۶ دقیقه انجام گرفت. برای ایمنوفلورسنت از آنتی‌بادی ثانویه همزمان با FITC (Fluorescein Isothiocyanate) به جای کیت LSAB استفاده شد و رنگ‌آمیزی مضاعف با رنگ هوخست (Hoechst) (۰/۵ mg/ml; Calbiochem) انجام شد.

### وسترن بلات

برای تشخیص کمی پروتئین‌های  $\beta$ -GSK-3 و بتا‌کتینین، تخمدان‌های فریز شده را در بافر لیزکننده (RIPA) (Radio Immunoprecipitation assay) لیز کرده و بعد از سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد [۸]، میزان ۵۰  $\mu$ g از پروتئین‌های استخراج شده روی ژل آکریل‌امید ۱۰ درصد تفکیک و به غشای نیتروسولوز منتقل شد. به منظور حذف اتصال غیراختصاصی، غشا با محلول بلاکینگ (BSA، Sigma ۳ درصد) انکوبه شد. انکوباسیون غشا با آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه طبق جدول ۱ صورت گرفت. آشکار سازی نهایی توسط کیت (Pierce) ECL (Enzymatic chemiluminescent) انجام و نتیجه روی فیلم

آبگیری، شفاف‌سازی و پارافین‌گیری، بلوک‌های پارافینی تهیه و برش‌های ۷ میکرومتری با روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد. سپس فولیکول‌های آنترال با قطرهای (۶۰۰-۴۰۰ میکرومتر = آنترال کوچک و ۱۰۰۰-۶۰۰ میکرومتر = آنترال بزرگ) شمارش شد. در این بررسی فولیکول‌های حاوی هسته اووسیت از هر ۱۰ برش یکی شمارش شد تا بدین ترتیب از دو بار شمارش یک فولیکول آنترال بزرگ که تقریباً هسته‌ای به قطر ۷۰ میکرون دارد، جلوگیری شود [۷].

### سنجش $\beta$ ۱۷ - استرادیول در خون

به منظور اطمینان از موفقیت تزریق PMSG در پیشبرد القا و تکوین فولیکولی، سنجش سطح استرادیول از قلب حیوانات مورد آزمایش حدود ۱/۵ میلی‌لیتر خون، قبل از تزریق PMSG و ۱۶، ۲۸، ۴۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق آن انجام گرفت. خون جمع‌آوری شده به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری و سپس با دور ۲۵۰۰-۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و از سرم رویی برای سنجش  $\beta$  ۱۷ - استرادیول خون به روش CIA (Chemiluminescence immunoassay) استفاده شد.

### ایمنو هیستوشیمی و ایمنوفلورسنت

تخمدان‌ها ۴۰ و ۴۸ ساعت پس از PMSG (فاز تکوین فولیکولی) خارج و با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شد (اتخاذ ساعت‌ها با توجه به افزایش استرادیول و آنالیزهای هیستوشیمی است که نشانگر فاز تکوین فولیکولی‌اند که مد نظر پژوهش حاضر است)، سپس از قالب‌های پارافینی تهیه شده، برش‌های ۷ میکرومتری تهیه و روی لام‌های پوشش یافته با ژلاتین چسبانده شد. بعد از مراحل آبگیری، شفاف‌سازی و پارافین زدایی، نمونه‌ها برای بازیابی آنتی‌ژنی به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سیترات ۹۰ درجه

## یافته‌ها

### مقایسه وزن و اندازه تخمدان‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق PMSG موجب افزایش وزن (دست نخورده:  $12/9 \pm 0/83$  mg و تجربی:  $24/6 \pm 2/33$  mg) و اندازه (دست نخورده:  $3102/8 \pm 74/75$   $\mu$ m و تجربی  $2076 \pm 151,37$   $\mu$ m) تخمدان‌ها شده است (شکل ۱، نمودار B, C).

### مقایسه بافت‌شناسی و شمارش فولیکولی و

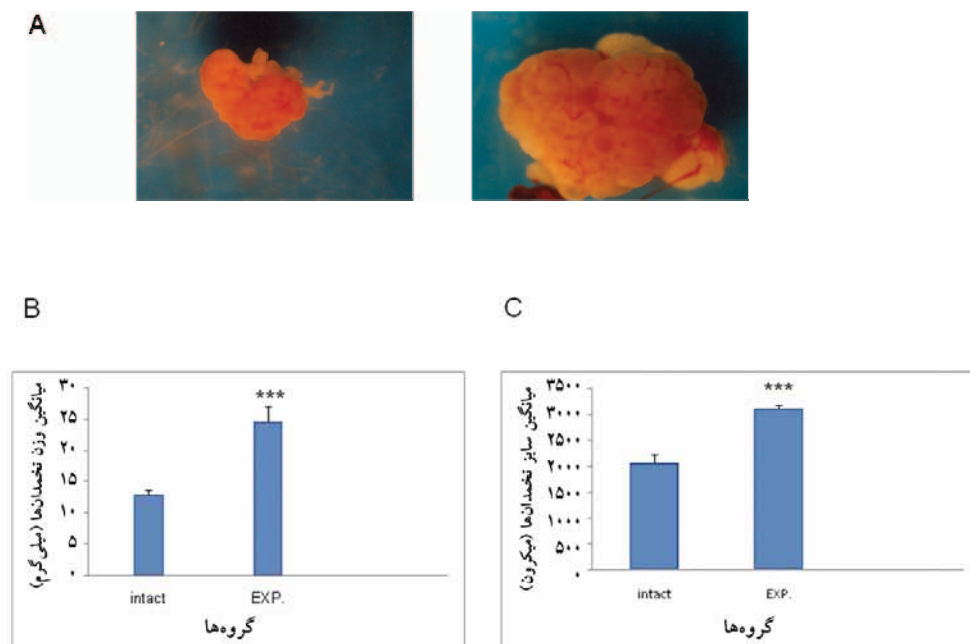
#### سنجش هورمونی

نتایج شمارش فولیکولی، افزایش بسیار معنی‌داری ( $P < 0.005$ ) در تعداد فولیکول‌های آنترال گروه تجربی ( $10/8 \pm 0/5831$  per ovary) نسبت به گروه دست نخورده ( $3/5 \pm 0/4743$  per ovary) نشان می‌دهد (شکل های ۲ و ۳).

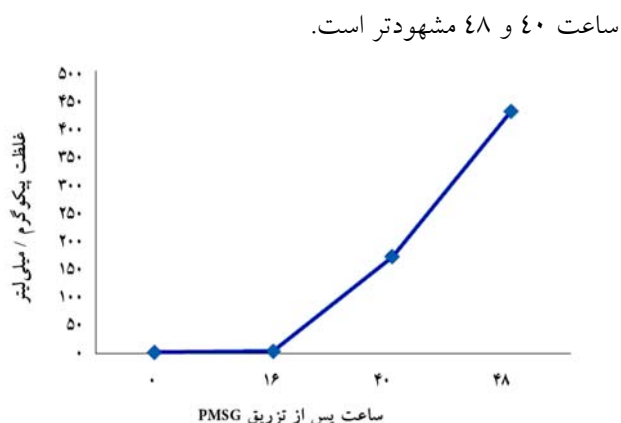
عکاسی ظاهر شد. برای اطمینان از میزان پروتئین انتقال داده شده روی ژل، غشا استریپ شد و با آنتی‌بادی‌های Pan, Total انکوبه شد. بررسی دانسیتمتری میانگین باندهای به دست آمده توسط برنامه Scion انجام شد.

### آنالیز آماری

نتایج همه گروه‌های کنترل و تجربی با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Anova استفاده شد و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت ( $Mean \pm SEM$ ) هستند. برای آنالیز کمی نتایج ایمونوهیستوشیمی، تصاویر میکروسکوپی برای خانم دکتر کازمارک (Kaczmarek) [۹] ارسال و آنالیز کمی توسط ایشان صورت پذیرفت..



شکل ۱. مقایسه وزن و اندازه تخمدان ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG در گروه تجربی و گروه دست نخورده. (A) تخمدان گروه دست نخورده (سمت چپ) و گروه تجربی (سمت راست). (B) وزن تخمدان (C) اندازه تخمدان. همان‌طور که مشاهده می‌شود وزن و اندازه تخمدان در گروه تجربی به‌طور چشمگیری نسبت به گروه دست نخورده افزایش یافته است ( $p < 0.005$ : Exp. Vs. intact).

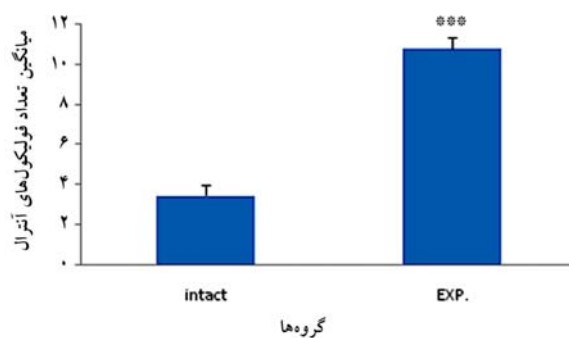


ساعت ۴۰ و ۴۸ مشهودتر است.

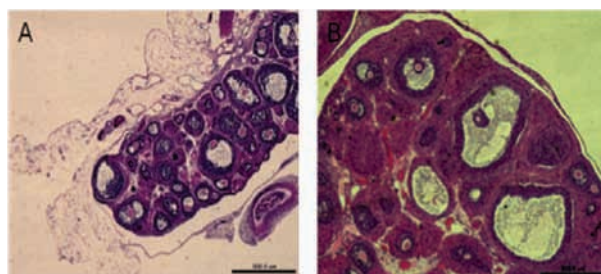
شکل ۴. غلظت هورمون ۱۷ بتاسترادیول در گروه تجربی قبل از تزریق PMSG و ۱۶، ۴۰، ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. غلظت هورمون ۱۷ بتاسترادیول با گذشت زمان به تدریج افزایش می یابد. داده ها به صورت (SEM ± mean) هستند (P < 0.05, n = 5).

### نتایج ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات

بررسی ایمونوهیستوشیمی در گروه تجربی و دست نخورده، نشان داد که GSK-3β در سلول های تکا، گرانولوزا و استرومای فولیکول های آنترال دیده می شود. بیان pGSK-3β (فرم فسفریله GSK-3β) در تخمدان گروه دست نخورده به طور بسیار ضعیف مشاهده شد در حالی که در تخمدان گروه تجربی، شدت رنگ آمیزی بیشتر از گروه دست نخورده بود. همچنین در گروه تجربی در ۴۸ ساعت نسبت به ۴۰ ساعت پس از PMSG کاهش بیان pGSK-3β مشاهده شد. بیان pGSK3β به ویژه در فولیکول های آنترال شدیدتر از سایر انواع فولیکولی است. به علاوه الگوی بیان pGSK-3β در تخمدان از نظر مکانی مشابه بوده ولی شدت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی pGSK3β نسبت به GSK-3β ضعیفتر است (شکل ۵). بررسی های کمی ایمونوهیستوشیمی -pGSK-3β توسط روش spatial visualization نیز نشان داد که در نمونه های تجربی ۴۰ ساعت پس از PMSG، بیان pGSK-3β به طور معنی داری (IHC.score)  $1179/43 \pm 73/03$  بیشتر از ساعت ۴۸ (IHC.score)  $364/14 \pm 47/64$  و نیز گروه دست نخورده است (شکل ۶).



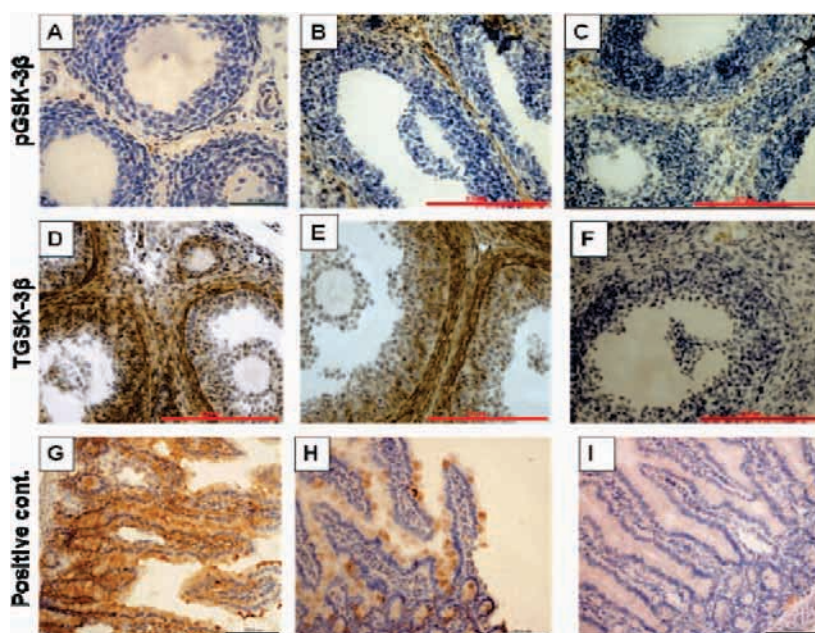
شکل ۲. تعداد فولیکول های آنترال در گروه تجربی و دست نخورده ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG. تعداد فولیکول های در حال رشد افزایش معنی دار در تخمدان گروه تجربی نسبت به دست نخورده را نشان می دهد. (\*\*\*)  $p < 0.005$ : Exp. Vs. intact), (n=5)



شکل ۳. فوتومیکروگراف از برش های تخمدانی رنگ آمیزی شده با روش H&E، ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG در گروه تجربی و گروه دست نخورده. (A) تخمدان گروه دست نخورده، (B) تخمدان گروه تجربی (AF: فولیکول آنترال). اندازه فولیکول ها در گروه تجربی نسبت به دست نخورده افزایش یافته است، به طوری که در گروه دست نخورده فولیکول های بزرگ مشاهده نمی شوند (بار: ۵۰۰ میکرون).

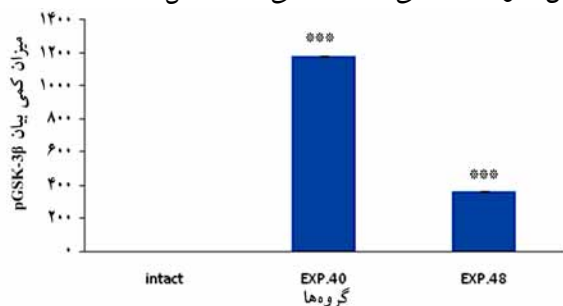
(گرچه تعداد فولیکول های آغازین - اولیه و پری آنترال گروه دست نخورده نسبت به کنترل کاهش نشان می داد اما از نظر آماری معنی دار نبود، بنابراین داده ها نشان داده نشده اند).

همچنین، نتایج سنجش سطح استرادیول خون قبل از تزریق PMSG ( $2/7 \pm 0/69$  pg/ml) و ۱۶، ۲۸، ۴۰ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق آن به ترتیب از چپ به راست ( $2/7 \pm 2/7$  pg/ml،  $19/6 \pm 1/75$  pg/ml،  $14/7 \pm 2/6$  pg/ml)، نشان داد که با گذشت زمان از تزریق PMSG - پیشرفت تکوین فولیکولی - سطح استرادیول خون نیز افزایش می یابد. همان طور که در (شکل ۴) مشاهده می شود این افزایش در دو



**شکل ۵.** فتومیکروگراف از تخمدان موش‌های گروه دست نخورده و تجربی رنگ آمیزی شده با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی جهت تشخیص پروتئین GSK-3 $\beta$ . بیان pGSK-3 $\beta$  تخمدان گروه دست نخورده (A) بیان pGSK-3 $\beta$  تخمدان گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG (B) بیان pGSK-3 $\beta$  تخمدان گروه تجربی ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG (C). بیان tGSK-3 $\beta$  تخمدان گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG (D,E) بیان tGSK-3 $\beta$  تخمدان گروه دست نخورده و تجربی (G)-Lایه گرانولوزا (T-لایه تک، -COC-کومولوس اووفروس و -S-استروما)، (F) کنترل منفی بافت تخمدان، (G) pGSK-3 $\beta$  بافت روده بعنوان کنترل مثبت (H) TGSK-3 $\beta$  بافت روده بعنوان کنترل مثبت، (I) کنترل منفی بافت روده. میزان بیان pGSK-3 $\beta$  در تخمدان موش‌های گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از PMSG افزایش قابل توجهی نسبت به ۴۸ ساعت و گروه دست نخورده یافته است در حالی که بیان tGSK-3 $\beta$  بدون تغییر باقی مانده است (مقیاس: ۲۵۰ میکرون).

مشاهده نشد در حالی که در نمونه کنترل مثبت (لوله گوارش جنین موش ۱۳ روزه) بیان آن به‌طور قوی مشاهده شد (شکل ۹). نتایج وسترن بلات نیز نشان داد که بیان بتاکتینین فعال در تخمدان گروه تجربی قابل توجه بوده و در نمونه ۴۸ ساعته (active/pan)  $1.0 \pm 1.5$  بیشتر از ۴۰ ساعت (active/pan)  $7.2 \pm 0.88$  است. همچنین، بیان میزان کل پروتئین بتاکتینین در بین نمونه‌ها تفاوتی را نشان نمی‌دهد (شکل ۱۰).

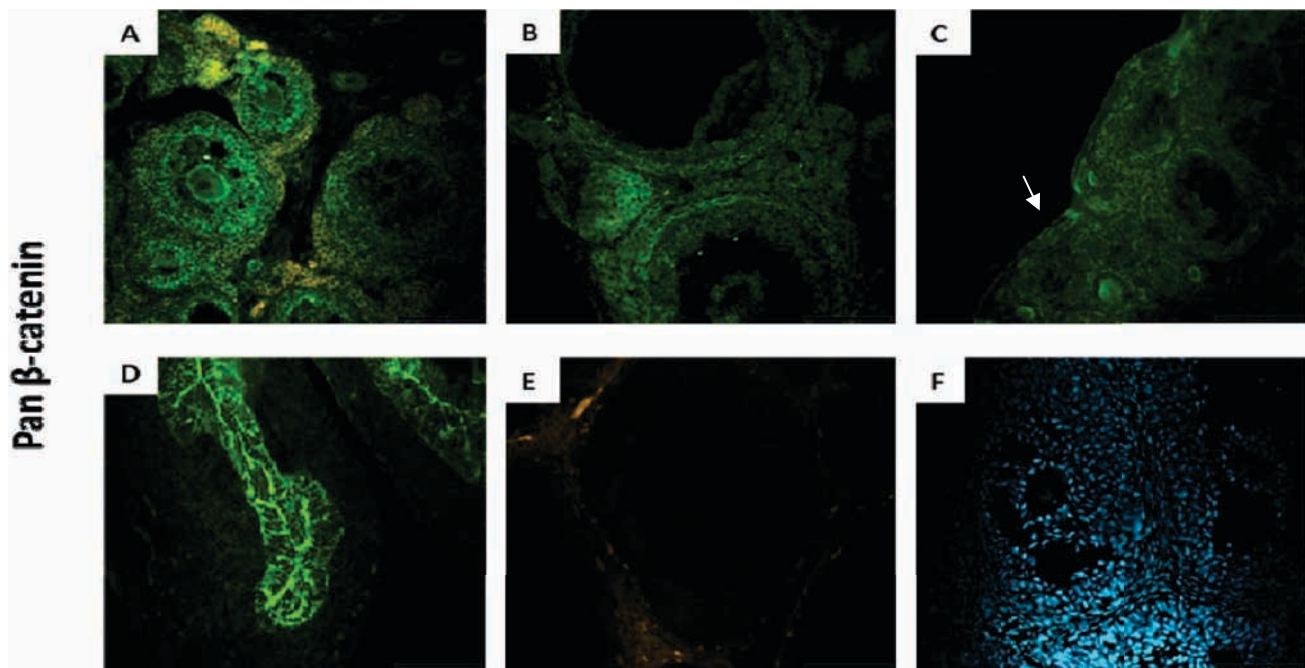


**شکل ۶.** آنالیز کمی ایمونوهیستوشیمی pGSK-3 $\beta$  در هر دو گروه تجربی ۴۰ و ۴۸ نسبت به دست نخورده افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین در گروه تجربی ۴۰ نسبت به گروه تجربی ۴۸ افزایش موجود معنی‌داری است. داده‌ها به صورت (mean+SEM) هستند، n=5. (\*\*\*)  $p < 0.005 = \text{Exp } 40,48 \text{ vs. intact}$  ,

همچنین با استفاده از روش وسترن بلات میزان کمی بیان این پروتئین‌ها بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که بیان pGSK-3 $\beta$  نسبت به بیان tGSK-3 $\beta$  در گروه دست نخورده صفر، در گروه تجربی ۴۰ ساعته  $0.98 \pm 0.7$  و در گروه تجربی ۴۸ ساعته  $1.09 \pm 0.5$  می‌باشد (شکل ۷). توسط ایمونوفلورسنت، بیان بتا کتینین در تخمدان‌های گروه دست نخورده، تجربی ۴۰ و ۴۸ بررسی و بیان بتاکتینین به‌صورت غشایی و سیتوپلاسمی در سلول‌های گرانولوزا و لایه تکا مشاهده شد. تفاوت الگوی قابل توجهی بین گروه تجربی ۴۰ و ۴۸ و نیز دست نخورده مشاهده نشد. به‌علاوه در هر دو گروه در فولیکول‌های آغازین، اولیه، پری‌انترال و آنترال‌های کوچک بیان بتاکتینین در هسته اووسیت نیز مشاهده شد (شکل ۸). بیان بتاکتینین فعال، به‌صورت هسته‌ای و سیتوپلاسمی است، در تخمدان گروه تجربی بیان ضعیف آن بیشتر به‌صورت سیتوپلاسمی در سلول‌های گرانولوزا و بیشتر در لایه تکا مشاهده شد و بیان هسته‌ای آن در معدودی از هسته‌های سلول‌های فولیکولی مشاهده شد. در تخمدان گروه دست نخورده بیان بتاکتینین فعال

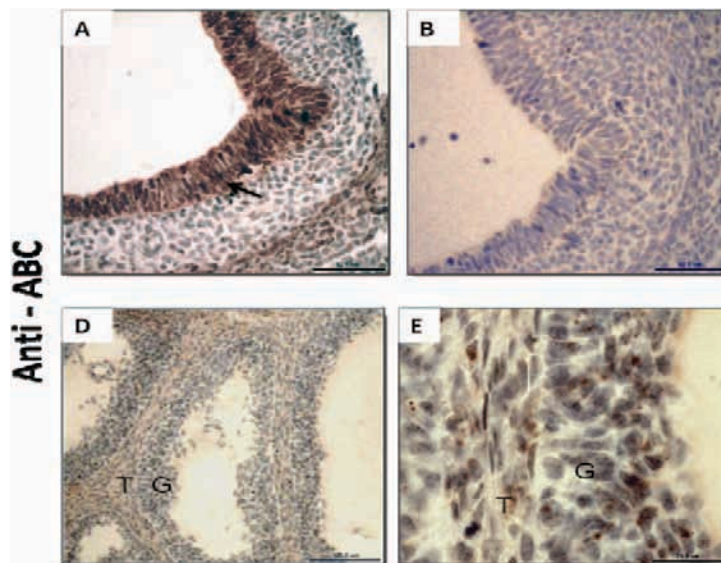


شکل ۷. وسترن بلات پروتئین  $GSK-3\beta$ . بافت تخمدان گروه تجربی ۴۰ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. همان‌طور که در ایمنو بلات‌های سمت چپ مشاهده می‌کنید میزان بیان  $p\ GSK-3\beta$  در تخمدان موش‌های گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG افزایش قابل توجهی نسبت به ۴۸ ساعت یافته است. درحالی که بیان  $TGSK-3\beta$  بدون تغییر می‌ماند. نمودار سمت راست نتایج دانسیتمتری شده باندها را به صورت عددی نشان می‌دهد. (\*\*\*) $p < 0.005$  (Exp.40,48 vs. intact and \* $p < 0.01$  = Exp.40 vs Exp.48)

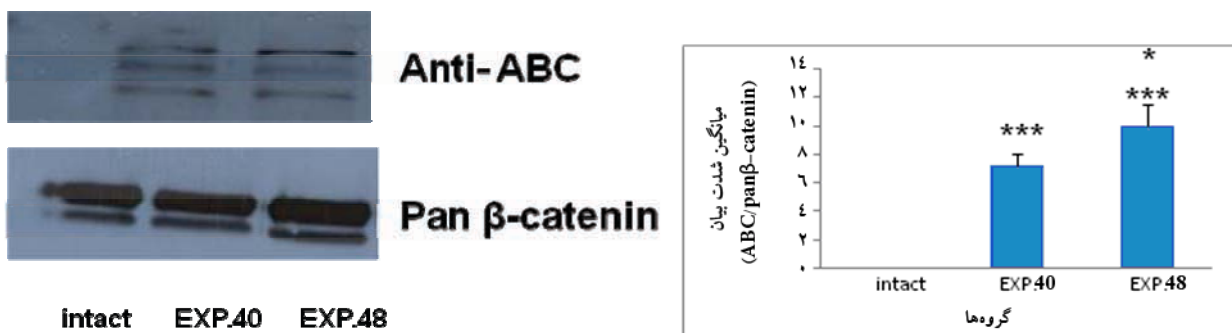


شکل ۸. فتومیکروگراف از تخمدان موش‌های گروه دست نخورده و تجربی رنگ آمیزی شده با استفاده از روش ایمنوفلورسنت برای تشخیص پروتئین بتاکتین ۴۰ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. (A) تخمدان گروه دست نخورده، (B) تخمدان گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG (G-لایه گرانولوزا و T-لایه نک)، (C) تخمدان گروه تجربی ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG (فلش - هسته اووسیت)، (D) بافت خارج تخمدان به عنوان کنترل مثبت، (E) کنترل منفی بافت تخمدان، (F) رنگ آمیزی مضاعف با هوخست. میزان بیان بتاکتین در تخمدان موش‌های گروه تجربی و دست نخورده تقریباً یکسان است (مقیاس: ۲۵۰ میکرون).





شکل ۹. فتومیکروگراف از تخمدان موش‌های گروه دست نخورده و تجربی رنگ آمیزی شده با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی جهت تشخیص پروتئین بتاکتینین فعال ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG (A). مقطع بافتی از لوله گوارش جنین موش (فلش - سلول‌های اپیتلیال لوله گوارش) به‌عنوان کنترل مثبت (مقیاس ۶۲/۵ میکرون)، (B) تخمدان گروه دست نخورده (مقیاس ۲۵۰ میکرون)، (C) تخمدان گروه تجربی ۴۰ ساعت پس از تزریق PMSG (G- لایه گرانولوزا و T- لایه تک) (مقیاس ۱۲۵ میکرون)، (D) C با مقیاس ۲۵ میکرون. میزان بیان بتاکتینین فعال در تخمدان موش‌های گروه تجربی نسبت به دست نخورده افزایش یافته است.



شکل ۱۰. وسترن بلات پروتئین بتاکتینین، بافت تخمدان گروه تجربی ۴۰ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. همان‌طور که از نتایج دانسیتمتری شده باندها در نمودار سمت چپ مشخص است، میزان بیان بتاکتینین فعال (anti-ABC) در تخمدان موش‌های گروه تجربی ۴۸ ساعت پس از PMSG نسبت به ۴۸ ساعت افزایش یافته است در حالی که میزان کل پروتئین بتاکتینین (pan β-catenin) بدون تغییر مانده است (\*\*\*) $p < 0.005$  vs. intact and  $p < 0.01$  vs. Exp.48.

## بحث

که با القای رشد فولیکولی توسط گنادوتروپین‌ها در تخمدان، میزان فسفوریلاسیون GSK-3 $\beta$  نسبت به گروه دست نخورده افزایش می‌یابد. همچنین بیان بتاکتینین فعال شده در مدل تخمدان تحریک شده با PMSG به‌کار رفته در این بررسی نیز با گذشت زمان از تزریق PMSG متناسب با افزایش استرادیول، افزایش می‌یابد و این در حالی است که تخمدان‌های گروه دست نخورده

از آنجا که مولکول‌های Wnt و رسپتورهای آن در تخمدان بیان می‌شوند [۶] و اهمیت این مسیر در تکوین و عملکرد فولیکول‌های تخمدانی توسط محققین گزارش شده است [۱۰]، بنابراین در پژوهش حاضر بیان دو عضو مهم از این مسیر یعنی GSK-3 $\beta$  و بتاکتینین در تخمدان موش‌های صحرایی تحریک شده با گنادوتروپین PMSG بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد

گنادوتروپین PMSG در فسفوریلایسیون  $GSK-3\beta$  طی روند تکوین فولیکولی است. نتایج و سترن بلات در این تحقیق نشان داد که بیان بتاکنین با گذشت زمان تزریق و افزایش تکوین فولیکولی (در ۴۸ ساعته نسبت به ۴۰ ساعته) افزایش می‌یابد. در حالی که در نمونه تحریک نشده با گنادوتروپین (دست نخورده)، بیانی مشاهده نشد. این نتایج قابل مقایسه با گزارش‌هایی است که عملکرد استرادیول را از طریق فعال‌سازی بتاکنین در سلول‌های نوروبلاستوما و نورون‌های قشری مغز معرفی کرده‌اند [۱۵]. همچنین گزارش شده است که در این سلول‌ها عملکرد استرادیول وابسته به زمان و غلظت بوده و مشابه با تیمار Wnt-3a است و نیز تیمار سلول‌های مذکور با استرادیول موجب افزایش تجمع بتاکنین می‌شود [۱۵]. نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد که گرچه فسفوریلایسیون  $GSK-3\beta$  در هر دو ساعت ۴۰ و ۴۸ پس از تزریق PMSG مشاهده می‌شود اما در ساعت ۴۸ که سطح استرادیول خون بیشتر از ساعت ۴۰ است، بتاکنین فعال بیشتری بیان می‌شود. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که بتاکنین مستقل از تغییرات  $GSK-3\beta$  و از طریق افزایش استرادیول فعال و پایدار شده و با ورود به هسته سلول‌های فولیکولی موجب القای پیشبرد تکوین فولیکولی می‌شود. ریدر (Rider) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز نشان دادند که در بافت رحم، پروژسترون موجب شروع مسیر سیگنال دهی Wnt از طریق مهار  $GSK-3\beta$  شده ولی انتقال بتاکنین به هسته و پایداری آن نیازمند استرادیول است [۴]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گزارش‌های فوق در بافت تخمدان نیز قابل تعمیم است و می‌توان چنین پیشنهاد کرد که در این بافت نیز گنادوتروپین با مهار  $GSK-3\beta$  شروع کننده مسیر Wnt بوده اما ادامه مسیر وابسته به میزان استرادیول است. همچنین گزارش شده است که تحریک سلول‌های رحمی به تکثیر و تمایز توسط استرادیول، موجب افزایش تجمع بتاکنین می‌شود [۴].

هیچ بیانی از این دو پروتئین را نشان نمی‌دهد. گنادوتروپین‌ها نقش اساسی در عملکرد و پاتولوژی تخمدان دارند. برای القا و تحریک تکوین فولیکولی موش‌های نابالغ معمولاً از PMSG که یک گنادوتروپین است، استفاده می‌شود. فعالیت PMSG وابسته به گونه بوده و قابل مقایسه با عملکرد گنادوتروپین‌های (follicle stimulating hormone) FSH و (luteinizing hormone) LH است. لذا PMSG می‌تواند به عنوان یک گنادوتروپین عامل مناسبی برای اتقاء مسیرهای تولید مثلی باشد [۱۱]. نتایج این بررسی نیز نشان داد که تزریق PMSG به موش‌های نابالغ، موجب افزایش وزن، اندازه و تعداد فولیکول‌های در حال رشد و در نتیجه تحریک تکوین فولیکولی می‌شود. نتایج سنجش هورمونی نیز نشان داد که به مرور و با گذشت زمان از تزریق PMSG، سطح استرادیول خون نیز همراه با پیشرفت تکوین فولیکولی افزایش می‌یابد. در موش‌های صحرایی هیپوفیزکتومی تیمار شده با نوعی گنادوتروپین نیز سطح استرادیول به تدریج از زمان تزریق تا دو روز بعد افزایش یافته و از آن پس تا روز چهارم به سطح اولیه باز می‌گردد [۱۲] و [۱۳]. بنابراین در این تحقیق بررسی‌های انجام شده در زمان قبل از تزریق و ۴۰ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG صورت گرفت یعنی در فاز رشد و تکثیر فولیکولی که برابر با زمان افزایش استرادیول خون است.

گرچه کنترل هورمونی رشد و تکوین فولیکولی، امری بدیهی و پذیرفته شده است اما در مورد مکانیسم مولکولی درگیر در آن اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد. به تازگی گزارش شده است که استرادیول از طریق مهار  $GSK-3\beta$  و ایجاد کمپلکس با بتاکنین عمل کرده [۱۴] و موجب پایداری بتاکنین و انتقال آن به هسته می‌شود [۱۵] و [۱۴]. نتایج ایمنوهیستوشیمی و سترن بلات  $pGSK-3\beta$  این تحقیق نیز، افزایش بیان را در نمونه‌های تحریک شده با گنادوتروپین نسبت به گروه دست نخورده نشان می‌دهد که مؤید اثر

فعال‌سازی بتاکتینین و پیشرفت تکوین فولیکولی می‌شود. همچنین با توجه به این یافته‌ها می‌توان پیشنهاد کرد که گرچه بیان pGSK-3 $\beta$  در طول تکوین فولیکولی بواسطه گنادوتروپین‌ها دستخوش تغییر می‌شود اما فعال‌سازی بتاکتینین مستقل از این تغییرات و متناسب با افزایش استرادیول است. این یافته‌ها همچنین نقش احتمالی مسیر سیگنال دهی Wnt را در القای رشد و تکوین فولیکول‌های تخمدانی توسط گنادوتروپین‌ها نشان می‌دهد.

### تقدیر و تشکر

از کارشناس آزمایشگاه سلولی - تکوینی سرکار خانم شیخ پور، آقای دکتر شاهرخ صفریان بابت راهنمایی‌هایشان و از خانم دکتر الزبیتا کازمارک برای آنالیز ایمنونوهیستوشیمی نهایت تشکر را داریم. این طرح با کمک و هزینه مالی پردیس علوم دانشگاه تهران انجام یافته است.

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نیز نشان داد که با افزایش سطح استرادیول خون میزان بیان بتاکتینین فعال افزایش می‌یابد. در تأیید نتایج بررسی حاضر، پن و وونگ (Wong & Pon) در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که گنادوتروپین‌ها موجب فعال‌سازی بتاکتینین در سلول‌های اپیتلیوم سطحی تخمدان (Ovarian surface epithelium-OSE) می‌شوند [۱۶]. مقایسه این نتایج با یافته‌های حاضر نشان دهنده اهمیت میان‌کنش استرادیول با بتاکتینین در پیشبرد تکوین فولیکول‌های تخمدانی است اما پیدا کردن مسیر عملکردی دقیق درگیر در آن با توجه به پیچیدگی‌ها و تداخلات متعدد مسیرهای سیگنال دهی به‌ویژه در سیستم *in vivo* بسیار سخت و نیازمند تحقیقات بیشتر است. در مجموع یافته‌های حاضر نشان دهنده این مطلب است که گنادوتروپین‌ها از طریق افزایش استرادیول موجب پایداری و

### References

1. **Arias AM, Brown AM, Brennan K.** Wnt signalling: pathway or network? *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 447-54
2. **Brennan KR, Brown AMC.** Wnt Proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 119-31.
3. **Hsieh M, Johnson A, Greenberge M, Richards S.** Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stage of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* 2002; 143(3):898-908.
4. **Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K, Fang J.** Progesterone initiates Wnt-b-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells, *J Endocrinol* 2006; 191: 537-48
5. Poutanen, Toward Understanding the Endocrine Regulation of Gonadal Somatic Cells, *News & Views. Endocrinology* 2000; 147 (8): 3662-5.
6. **Richen A, Lochhead P, Kontogianea M, Farookhi R.** Wnt Signaling in the Ovary: Identification and Compartmentalized Expression of wnt-2, wnt-2b, and Frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* 2002; 143(7): 2741-9.
7. **Muskhelishvili L, Wingard SK, Latendresse JR.** Proliferating Cell Nuclear Antigen- A marker for Ovarian Follicle Counts. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 365-8.
8. **Bradford JM, Piest RF, Spomer RG.** Failure Sequence of Gully Headwalls in Western Iowa. *Soil Sci Soc Am J* 1978; 42: 323-28.
9. **Nieruchalska E, Strzelczyk R, Woźniak A, urawski J, Kaczmarek E, Salwa-urawska W.** A quantitative analysis of the expression of a-smooth muscle action in mesangioproliferative (GnMes) glomerulonephritis. *Folia Morph* 2003; 62: 451-3.

10. **Richards JS, Ochsner S, Russel DL, Falender AE, Hsieh MN, Doyle KH, Sharma Sc.** Novel signaling pathways that control follicular growth and ovulation. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 195-220.
11. **Engelbreget MJT, Weissenbruch MMV, Snijders, Delemarre-van Waal HA.** Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats; follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *J Endocrinol* 2002; 173: 297-304.
12. **Mcgee EA, Hsueh AJW.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev* 2000; 21(2): 200-14.
13. **Kim H, Yamanouchi K, Nishihara M.** Expression of ski in the granulose cells of atretic follicles in the rat ovary. *Reprod Dev* 2006; 6: 715-21.
14. **Varea O, Garrido J, Dopazo A, Mendez P, Segura L, Wandosell F.** Estradiol activates  $\beta$ -catenin dependent transcription in neurons, *Plos one*. 2009, 4, e5153.
15. **Gomez C, Perez M, avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F.** Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3 and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25: 363-73.
16. **Pon YL, Wong AST.** Gonadotropin-induce apoptosis in Human Ovarian Surface Epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the  $\beta$ -catenin/T-cell factor signaling pathway. *Mol Endocrinol* 2006; 20(12): 3336-50.