

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

تهمینه پیروی<sup>۱</sup>، شیوا روشن میلانی<sup>۲</sup>، سیامک سلامی<sup>۳</sup>، محمد قادری<sup>۴</sup>، علیرضا شمس<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۵</sup> 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 می‌شود و روی تمایز سلولی و ایجاد فولیکول‌های آترتیک تاثیر می‌گذارد. با توجه به این که مرگ سلول‌های گرانولوزا طی روند آترزی فولیکولی به واسطه پدیده آپوپتوز صورت می‌گیرد. ما در این مطالعه وقوع آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدان موش صحرایی را تحت تاثیر یکی از آگونیست‌های GnRH یعنی بوسرلین استات مورد بررسی قرار می‌دهیم.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی موردی - 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=۶) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه آزمایش و کنترل به ترتیب روزانه به مقدار ۰/۲ mg/kg بوسرلین و سرم فیزیولوژیک به مدت چهار روز دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، موش‌ها با دوز کشنده کلروفورم بیهوش، سپس تخمدان‌ها خارج شدند. نمونه‌ها 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 برش‌های بافتی از روش تانل پی او دی استفاده شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار Graphpad instant و آزمون independent t-test آنالیز شدند و سطح معنی داری  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

**نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد میانگین درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل ( $0/52 \pm 2/14$ ) و در گروه آزمایش ( $1/71 \pm 3/75$ ) و ( $P \leq 0/001$ ) بود. از نظر آماری این اختلاف افزایش معنی دار بود.

**نتیجه گیری:** این یافته‌ها بیانگر این مطلبند که بوسرلین، آپوپتوز را در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدان افزایش می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** آپوپتوز، TUNEL POD، بوسرلین، سلول‌های 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 گنادوتروپین‌های هیپوفیزی فولیکول‌ها به طور متناوب در یکی از تخمدان‌ها شروع به رشد می‌نمایند. یعنی ابتدا ارگانل‌های داخل اووسیت اولیه افزایش یافته و سپس سلول‌های فولیکولی از حالت سنگفرشی به حالت مکعبی تبدیل شده و تکثیر می‌یابد و چندین لایه در اطراف اووسیت ایجاد می‌نمایند (۲).

سلول‌های حاصل از تقسیم سلول‌های گرانولوزا می‌نامند که در رشد و تامین تغذیه اووسیت از طریق تماس در ناحیه زوناپلوسیدا نقش دارند (۱). فولیکول‌های رشد یافته و بالغ در اثر افزایش ترشح ناگهانی LH، پاره شده و اووسیت ثانویه آزاد می‌گردد (۲). ترشح گنادوتروپین‌ها (LH,FSH) که رشد و اوولاسیون فولیکول را کنترل می‌نمایند تحت کنترل ترشح پالسی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) هیپوتالاموسی است که با باز شدن کانال‌های کلسیمی آغاز و باعث به وجود آمدن سیکل جنسی می‌گردد (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 می‌گردد که باعث رشد فولیکول‌ها می‌شود. در اواسط سیکل با افزایش پالس‌های GnRH ترشح LH نسبت به FSH بیش تر می‌گردد که مقدمه‌ای برای اوولاسیون است (۴). بعد از اوولاسیون پالس‌های GnRH به تدریج کاهش یافته و منجر به کاهش آزادسازی LH و FSH می‌گردد. بنابراین این روند به هماهنگی هورمون‌های هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادی وابسته است (۵).

اختلال در هر یک از قسمت‌های فوق منجر به ناباروری می‌گردد. امروزه در دنیا برای رفع مشکل

ناباروری روش‌های مختلفی رایج شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از آگونیست‌های صنایع GnRH مانند بوسرلین اشاره نمود. بوسرلین یکی از آگونیست‌های GnRH با دو استخلاف است. این دارو عملکرد هورمون آزاد کننده هیپوتالاموس را تقلید می‌کند (۶).

تجویز اولیه یا متناوب بوسرلین مانند تولید طبیعی LHRH از هیپوتالاموس ترشح هورمون لوتهال (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH) را از هیپوفیز قدامی با افزایش گیرنده‌های GnRH تحریک می‌کند. با این وجود تجویز مداوم و روزانه بوسرلین ترشح LH و FSH را به علت تنظیم کاهشی گیرنده‌های GnRH مهار می‌نماید (۶).

تجویز بوسرلین جهت درمان ناباروری با دوز ۲۰۰-۵۰۰ میکروگرم روزانه به صورت زیر جلدی غیرپالسی در ابتدای فاز فولیکولار (روز اول قاعدگی) یا میانه فاز لوتهال (در روز ۲۱ قاعدگی) شروع شده و بایستی تا Down Regulation هیپوفیز ادامه یابد. در صورت نیاز دوز دارو به ۵۰۰ میکروگرم در روز و به صورت دو بار تزریق زیرجلدی افزایش می‌یابد (۴). از این دارو به منظور جلوگیری از تحریک بیش از حد تخمدان‌ها به دنبال استفاده از داروهای محرک تخمک گذاری مانند کلومیفن سیترات و HMG و FSH جهت جلوگیری از رشد زودرس فولیکول‌ها استفاده می‌شود (۶).

با توجه به اهمیت سلول‌های 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 آپوتوز ما تصمیم به انجام بررسی حاضر گرفتیم. علت انتخاب موش‌های صحرایی نابالغ ترشح بسیار کم هورمون GnRH است. در نتیجه با تزریق بوسرلین هر گونه تغییر در تعداد سلول‌های آپوتوتیک ناشی از تزریق می‌باشد.

## 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  $10/53 \pm 44/37$  گرم تهیه و به دو گروه آزمایش و کنترل ( $n=6$ ) تقسیم شدند. موش های صحرایی گروه آزمایش و کنترل به ترتیب روزانه به مقدار  $mg/kg$   $0/2$  آگونیست GnRH (Buserelin)  $1 mg/ml$  (Aventis Pharma. Deutschland GmbH) و سرم فیزیولوژیک  $0/9\%$  (Clearflex, Switzerlandflex) به مدت چهار روز دریافت کردند ( $24.7$  ساعت بعد از آخرین تزریق موش های صحرایی گروه های آزمایش و کنترل ابتدا با اتر بی هوش و بافت تخمدان آنها از حفره شکم خارج شد. سپس نمونه ها به مدت  $48$  ساعت در فرمالین  $10\%$  در دمای اتاق فیکس شدند. پس از انجام مراحل پاساژ بافت از نمونه ها برش های  $10-7$  میکرونی تهیه و با کیت تانل پی او دی رنگ آمیزی شدند.

ابتدا اسلایدها را در محلول گزیلول جهت برداشت پارافین به مدت  $5$  دقیقه در سه ظرف متوالی قرار داده شدند، سپس نمونه ها با الکل با درجات نزولی آبدهی و با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو شدند. اسلایدها توسط پروتئیناز K ( $30 \mu g/ml$ ) به مدت  $30$  دقیقه در دمای  $37$  درجه سانتی گراد پرمئابلیزه و با PBS شسته شدند. برای بررسی میزان آپوپتوز از کیت Cell Death Detection (Roche) استفاده گردید. این کیت انتهای آزاد  $3' OH$  DNA را به کمک ترمینال ترانسفراز اپتیمال (TdT) فلورسانس duTP نشان دار می نماید. سپس از یک آنتی بادی آنتی فلورسانس POD کونژوگه با پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase= HRP) برای قابل مشاهده نمودن POD از دی آمینوبنزیلیدین به عنوان یک سوبسترا استفاده شد.

اسلایدها با مخلوط واکنش تانل به مدت  $60$  دقیقه در محیط مرطوب و دمای  $37$  درجه سانتی گراد انکوبه و

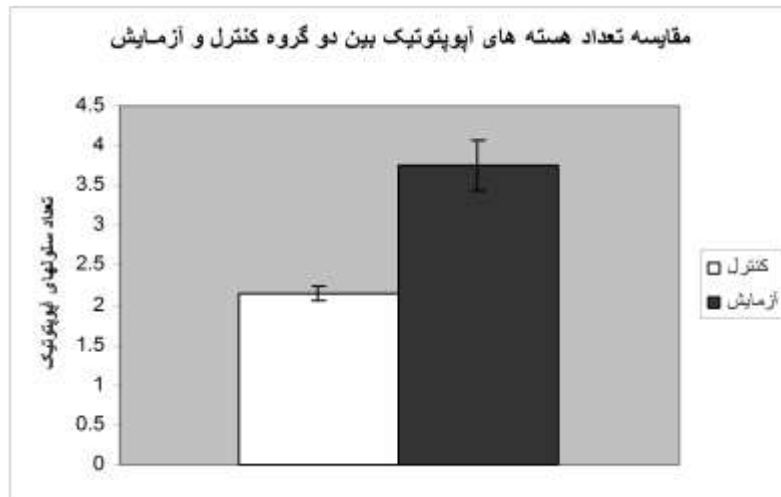
سپس دوبار در PBS شستشو شدند. بعد از چند بار شستشو، دی آمینوبنزیلیدین (DAB= DiaminoBenzidin) به مدت  $10$  دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه شد. سپس در PBS شسته و بر روی لام برای مطالعه با میکروسکوپ نوری مونته شدند. برای کنترل جواب ها یک نمونه کنترل مثبت انجام دادیم و با DNase در DNA شکستگی القا نمودیم و تعداد سلول های تانل مثبت توسط دو کارشناس در فولیکول های تخمدان ها در نمونه کنترل و آزمایش شمارش شدند. برای تهیه عکس از بافت ها 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  $p \leq 0/05$  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 ( $1/71 \pm 3/75$ ) و در گروه کنترل ( $0/52 \pm 2/14$ ) 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

Pv	گروه کنترل (n=6)	گروه آزمایش (n=6)	گروه ها شاخص ها
-/0001	$2/14 \pm 0/52$	$3/75 \pm 1/71$	میانگین درصد سلول های آپوپتوتیک (Mean $\pm$ SD)



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد سلول های گرانولوزایی آپوتوتیک در بین گروه های آزمایش و کنترل را نشان می دهد.

هضم DNA به قطعات ۱۸۰-۲۰۰ جفت بازی در تخمدان وجود دارد. عمل این اندونوکلاز وابسته به Ca/Mg است. احتمالاً 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 آپوتوز در سیستم های سلولی متعدد می گردد (۸ و ۱۰).

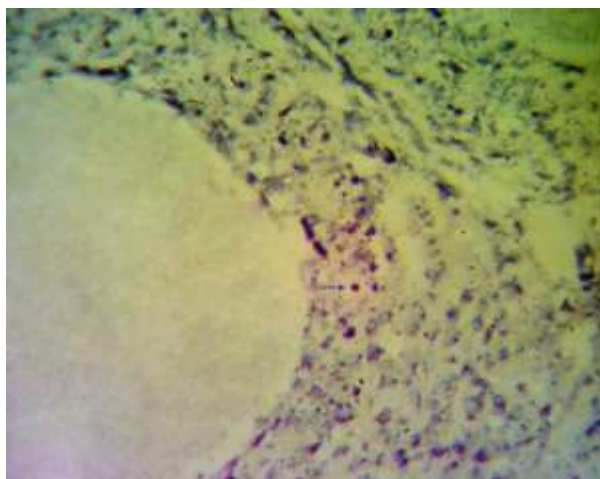
نتایج ما نشان داد که بوسریلین باعث افزایش معنی داری در میزان سلول های آپوتوتیک می گردد و با نتایج مطالعه Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد. نتایج آنها نشان داد که بوسریلین باعث افزایش مستقیم بروز آپوتوز در کشت سلول های گرانولوزای انسانی و خوک می شود. با توجه به این که آنها از دوز های مختلف آگونیست استفاده کرده بودند. پیشنهاد دادند که تعیین دوز کاربردی آگونیست GnRH در کلینیک با توجه به اثرات آپوتوتیک 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، آپوتوز و تولید استرادیول و پروژسترون در کشت سلول های گرانولوزای خوک در مراحل مختلف تکامل فولیکولها انجام داده بودند و نشان دادند که آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین اثر مهارى در

معنی داری افزایش می دهد (جدول ۱) و (نمودار ۱) و (اشکال الی ۴).

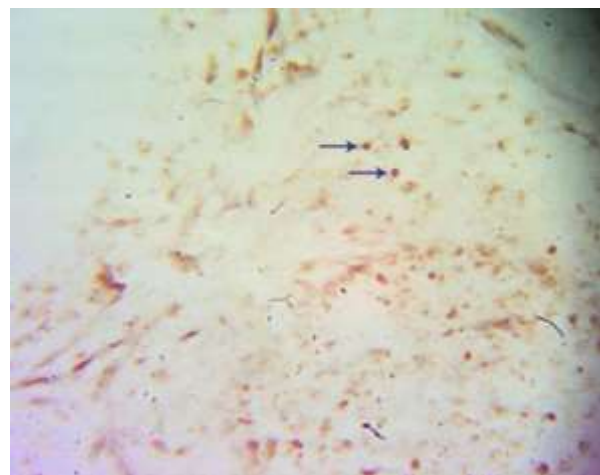
## بحث

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 آپوتوتیک در سلول های گرانولوزا می گردد. می توان نتیجه گرفت که بوسریلین علیرغم مزایایی که دارد دارای مضراتی نیز می باشد.

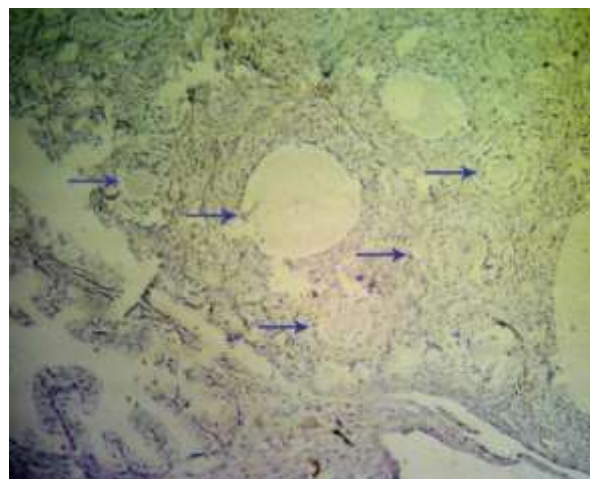
مطالعات محققان قبلی نشان داد ه اند که بوسریلین از طریق گیرنده های هورمون آزاد کننده گنادوتروپینها عملش را القا می کند و باعث افزایش آپوتوز در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدانی می گردد. یک اندونوکلاز اختصاصی مسئول شکستگی و



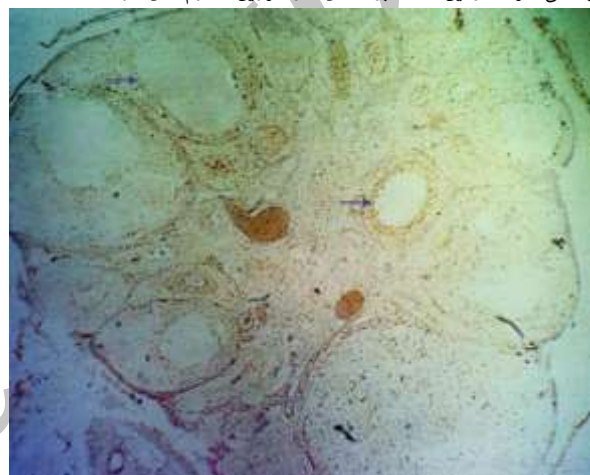
۲- فتومیکروگرافی از سلول های گرانولوزایی دیواره فولیکول گروه کنترل با عدسی با بزرگنمایی ۴۰X را می بینید در این شکل نوک فلش هسته آپوتوتیک را نشان می دهد.



۴- فتومیکروگرافی از سلول های گرانولوزایی آپوتوتیک دیواره فولیکول گروه آزمایش با عدسی با بزرگنمایی ۴۰X را می بینید در این فتومیکروگراف نوک فلش ها هسته های آپوتوتیک را نشان می دهند.



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



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

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 آپوتوتیک و ضد آپوتوتیک اهمیت به سزایی دارد و مختل شدن این تعادل می تواند 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 می کند. این یافته ها می تواند یک زمینه تحقیقاتی مناسب برای مطالعات آینده در مورد بافت تخمدان باشد.

تکثیر و تولید هورمون ولی اثر مثبت بر روی آپوپتوز نشان می دهد. اثر مهاری آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین در ترشح هورمون ها در سلول های گرانولوزای فولیکول های بزرگ غالب بود در حالی که 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 آزاد 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 هاله ای از ابهام قرار دارند. شناخت کامل آپوپتوز، عوامل

## 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 of Endocrinology .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.

Archive of SID

# 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.  $P \leq 0/05$  was statistically considered significant.

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

**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