Archive of SID

نقش هيالورونان در طي تكامل فوليكول تخمداني موش

دكترسيد محمد حسيني پناه*[1]، دكتر محمد آهي[2]، دكتر مهران حبيبي رضائي[3]، دكتر مصطفي حسيني[4]،
ولي ا.. مرادي[5]، علي اكبر رجب زاده[5]

تاريخ دريافت: 85/6/15 تاريخ پذيرش:85/11/15

چكيده

مقدمه: هيالورونان، گليكوزآمينوگليكان بسيار طويلي است كه با ساير گليكوزآمينوگليكان ها متفاوت بوده و در مادة خارج سلولي آزاد ميشود. اين ملكول ها در شكل گيري ماتريكس، چسبندگي سلول به سلول و سلول به ماتريكس، تكثير و مهاجرت سلولي نقش دارند و تغييرات مشخصي را در طول تكامل فوليكول تخمداني ايجاد مي كنند. هدف از اين تحقيق تغييرات اسيد هيالورونيك در قسمت هاي مختلف فوليكول در طول چرخه تخمداني است.

مواد و روش ها: در اين مطالعه تجربی تعداد شصت سر موش با نژاد N-MARI و با وزن 30-25 گرم از موسسه رازي كرج خريداري شد. پس از عادت به شرايط آزمايشگاه و رسيدن به سن بلوغ (هشت تا ده هفتگي) مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از تغيير نماي سيستم تناسلي خارجي كه دال بر شروع چرخة تخمداني بود، تخمدان آنها خارج گرديد و تغيير حضور هيالورونان با استفاده از روش هيستوشيميائي مورد ارزيابي قرار گرفت.

يافته های پژوهش: با استفاده از رنگ آميزي با آلسين بلو، pH=3/2، هيالورونان در قطعات بافتي تهيه شده از تخمدان ارزيابي شد. براساس مشاهدات بعمل آمده بيان هيالورونان در طول تكوين فوليكول ها تا مرحلة قبل از تخمك گذاري افزايش مي يابد. ساخت هيالورونان در منطقة شفاف، غشاء پايه و سلولهاي تك داخلي فوليكول روندي افزايشي را تا انتها طي ميكند، اما در سلول ها و مايع فوليكولي بعد از مرحله آنترال كاهش نشان مي دهد.

نتيجه گيری نهايی: بنابراين نتيجه مي گيريم كه بيان هيالورونان براي گسترش مجموعة سلولي كومولوس اووفروس، بيرون پريدن اين مجموعه به هنگام تخمك گذاري و افزايش سرعت حركت اسپرم جهت عمل لقاح مورد نياز مي باشد.

1- استاديار گروه آناتومی، دانشكده پزشكی، دانشگاه علوم پزشكی همدان Email: hosseinipanah@hotmail.com

2- استاديار گروه آناتومی، دانشكده پزشكی، دانشگاه علوم پزشكی ايلام
3- استاديار گروه بيوتكنولوژی، دانشكده علوم، دانشگاه تهران.
4- استاديار گروه آمار زيستی، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكی تهران
5- مربی گروه بافت شناسی، دانشكده پزشكی، دانشگاه علوم پزشكی همدان

www.SID.ir

Archive of SID

واژه هاي كليدي: هیالورونان، تکامل، فولیکول، تخمدان، موش.

مقدمه

تشكيل گامت ها در روند تكاملي نياز به تغييراتي در سطح سلول ها دارند. براي مثال سلول در بيان ملكول هاي مسئول چسبندگي خود، تغييراتي ايجاد مي كند. اين مولكولها شامل مولكول هاي چسبندگي سلول به سلول، سلول به ماتريكس و مولكولهاي موجود در ماتريكس خارج سلولي هستند. تغيير در چسبندگي سلول ها مي تواند تغيير شكل سلول را به همراه داشته و يا حركت و عمل سلول را تغيير دهد(1). بسياري از مولكولهاي سطح سلول و ماتريكس خارج سلولي كه در چسبندگي سلول به سلول و سلول به ماتريكس نقش دارند، در واقع تركيبات قندي مي باشند(2). اين مولكول ها شبكه هاي فيبريلار از پروتئو گليكان ها و گليكوپروتئين ها را در ماتريكس خارج سلولي مي سازند و شامل مولكول هاي متصل به سطح سلول و مولكول هاي مسئول چسبندگي سلول مي باشند. از طرفي اين مولكول ها از مواد عمدة ماتريكس خارج سلولي بشمار مي روند و هر كدام يك يا چند گيرندة اختصاصي در روي غشاء سلول داشته كه به آنها متصل مي شوند(3). از طريق اين گيرنده ها اطلاعاتي كه تغييرات ساختماني را تنظيم مي كند، بداخل سلول منتقل شده و بسياري از پديده هاي زيستي از قبيل چسبندگي، رشد، مرگ برنامه دار سلولي و تمايز را متاثر مي نمايد(4).

اهميت بخش كربوهيدراتي اين تركيبات و همين طور قند انتهائي آنها در پديده هاي بيولوژيك و در مسير تكامل توسط بسياري از محققين عنوان شده است(5).

هيالورونان به ميزان زيادي در ماتريكس خارج سلولي كومولوس اووفروس وجود دارد كه در تسهيل عمل لقاح نقش داشته و تعدادي از اعمال آكروزوم را بعد از اتصال اسپرم به زونا پلوسيدا افزايش مي دهد(6) و در تكامل اووسيت هاي بالغ و لقاح يافته در مرحلة بلاستوسيست نقش دارد(7). هيالورونان در نفوذ پذيري اسپرم و عمل متقابل گامت ها نقش داشته و در تحرك اسپرم مؤثر است. از آنجائي كه تحرك اسپرم يك فاكتور مهم در عمل لقاح

مي باشد لذا هيالورونان مي تواند بعنوان يك عامل افزايش دهندة تحرك اسپرم در لقاح مطرح گردد (8).

با كمك تكنيك هاي هيستوشيميائي خاص ميتوان تركيبات قندي را با رنگ هاي قابل رؤيت نشاندار كرد. برخي از اين تكنيك ها نظير محلول آلسين بلو در pH هاي مختلف مي تواند تركيبات قندي با بار منفي را كه با تركيبات ماتريكس خارج سلولي و يا سطح سلول ارتباط دارند، مورد شناسايي قرار دهد(9).

چرخة تخمداني با شروع رشد در چند فوليكول آغاز شده و جريان مداومي از تكامل فوليكول ها را شكل مي دهد كه در اين روند از مراحل مختلف تكاملي عبور نموده تا تخمك گذاري انجام شود(10). در اين روند ساخت و ترشح گليكوپروتئين ها توسط اووسيت و سلول هاي فوليكولي از اهميت بالايي برخوردار است. با توجه به روندي كه سلول هاي مختلف بافت تخمداني در طي چرخة فوليكولي دارند و همراه با بيان گليكوپروتئين ها در سطح سلولي است لذا نقش گليكوزآمينوگليكان اسيد هيالورونيك يا هيالورونان را در طي تكامل فوليكول ها در تخمدان موش مورد ارزيابي قرار داديم.

مواد و روش ها

تعداد شصت راس موش باكره(virgin) از نژاد N-MARI كه در سن پنج هفتگي قرار داشتند از مؤسسة رازي كرج خريداري شد. سپس جهت عادت به محيط و همچنين رسيدن به سن بلوغ (هشت تا ده هفته) در شرايط استاندارد نگهداري شدند. با مشاهدة ناحية واژينال و وجود علائمي از سيكل تخمداني انتخاب و سپس با قطع نخاع كه منجر به مرگ حيوان مي شد، به دقت تشريح گرديده و بلافاصله تخمدان ها خارج شد و در محلول فرمالين 10% تازه تهيه شده قرار گرفتند.

نمونه هاي فوق به روش معمول بافت شناسي پاساژ داده و سپس بلوكهاي تهيه شده بكمك ميكروتوم با ضخامت 3µm بريده شدند(9). سپس روش های رنگ آميزی هيستوشيمي آلسين بلو با pH=3/2 انجام شد.

پس از بررسي لام هاي رنگ شده، هر بخش اختصاصي از بافت تخمداني براساس شدت واكنش به رنگ ها از صفر تا چهار بر طبق جدول زير درجه بندي گرديد. طريقة درجه بندي شدت رنگ ها در اين مطالعه طبق جدول زير و بر اساس كار Gony و همكارانش انجام شد(11).

www.SID.ir

Archive of SID

راهنماي درجه بندي شدت رنگ آميزي

رتبه ها	توضيح
0	هيچ رنگي مشاهده نشد
1	شدت رنگ آميزي : بسيار كم
2	شدت رنگ آميزي : كم
3	شدت رنگ آميزي : متوسط
4	شدت رنگ آميزي : زياد

جداول مربوط به هر رنگ آميزی تهيه گرديد و پس از كدگذاری اطلاعات فوق توسط كامپيوتر و به روش آناليز واريانس يک طـرفه ی غيرپارامتری كروسكال- واليـس (Kruskall- Wallis) و توسط برنامه SPSS آناليز شد.

يافته های پژوهش

فوليكول بدوي:

واكنش اجزاء مختلف اين فوليكول نسبت به محلول آلسين بلو با pH=3/2 منفي بود.

فوليكول بينابينی:

واكنش با شدت بسيار كمی نسبت به محلول آلسين بلو با pH=3/2 ديده شد بجز آن كه نسبت به منطقه شفاف با شدت متوسط و نسبت به غشاء پايه با شدت كم مشاهده گرديد (شكل A-1).

فوليكول اوليه:

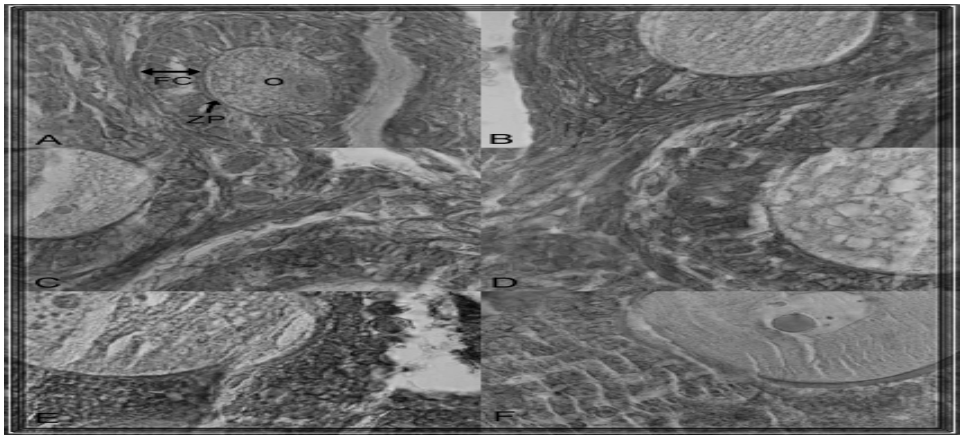
واكنش با شدت متوسطي در مايع فوليكولي، منطقه شفاف و غشاء پايه ديده شد ولي در سـاير قسمت هـا واكنش با شدت بسيار كم وجود داشت (شكل B-1).

فـوليكول آنتـرال و بعـد از تشكيـل آنتروم(Postantral):

واكنش با شـدت كم در قسمت هـاي مختلف فوليكول وجود داشت كه در مايع فوليكولار با شدت متوسط و در منطقه شفاف و غشاء پايه با شدت زياد ديده شد (اشكال C-1، D-1، E-1).

فوليكول قبل از تخمك گذاري:

واكنـش با شـدت كم در مـايع فـوليكولار و سيتوپلاسم اووسـيت و بـا شـدت متـوسط در سلـول هـاي فوليكولي و تكـا و با شـدت زياد در منطقة شفاف و غشاء پايه همراه بود (شكل F-1).



شكل 1: واكنـش مراحل مختلف تكامـل فوليكول با استفاده از محلـول آلسين بلو با pH=3/2 نشان داده شده است (بزرگنمايي مقاطع 1000)A) فوليكول بينابيني، B) فوليكول اوليه، C) فوليكول Preantral، D) فوليكول Antral، E) فوليكول Postantral، F) فوليكول Preovulatory.
.O= Oocyte, ZP= Zona Pellucida, FC= Follicular Cells

بحث و نتيجه گيری

با توجه به نتايج اين تحقيق بيان اسيد هيالورونيك در مرحلة فوليكول بينابيني در منطقة شفاف صورت مي گيرد و سپس به شدت آن افزوده گشته تا اينكه در مرحلة فوليكول آنترال و بعد از تشكيل آنتروم به حداكثر ميزان خود مي رسد و

www.SID.ir

Archive of SID

سپس در مرحلة قبل از تخمك گـذاري از شـدت آن كاسته مي شـود. تشكيل اين منطقه حاصل مشـاركت سلول هـاي اووسيت و فوليكـولار مـي باشـد. بنابراين ساخت اسيد هيالورونيك نيـز توسـط اين سلول هـا صورت مي گيرد. از طرف ديگر حضور هيالورونان در مايع فوليكولي از مرحلة فوليكول اوليه شروع و سپس بر ميزان شدت آن افزوده گشته تا همچنين در مرحلة قبل از تخمك گذاري از شدت آن كاسته مي شود. بنابراين سلول هاي فوليكولار اين گليكوزآمينوگليكان را هم در بين خود يعني مايع فوليكولار ترشح نموده تا در هنگام تخمك گذاري كمك به جداشدن مجموعة سلولي كومولوس اووفروس و سپس رها شدن از فوليكول گردد.

اين مـوضـوع توسـط Tirone و همـكـاران در سـال 1997 (12) چنيـن بـيـان شـده اسـت كـه اسـيـد هيـالـلـورونيـك توسـط سـلـول هـاي

كومـولـوس2-3 ساعت بعد از آنكه تحت تاثير تحريك گونادوتروپين ها قرار گرفت ساخته شده و مقدار آن 4 تا 10 ساعت بعد به حداكثر ميرسد. سپس شروع به كاهـش نمـوده كه اين پديده 18 ساعت بعـد رخ مي دهـد. بنابراين با توجه به نتايج كسب شـده كـه حاكي از افـزايش تدريجي اسيد هيالورونيـك در تكامـل فوليكول ميباشد بيانگر اين مطلب است كه بلوغ مجموعة سلول كومولوس و اووسيت پستانداران در مرحلة قبل از تخمك گذاري سبب در گيري تركيب ماتريكس خارج سلولي غني از هيالورونان را به وسيلة سلول هاي كومولوس دارد كه حداقل دو ژن كدكنندة اين پروتئين ها وجود داشته كه در انسان و موش مشابه مي باشند(13).

اطلاعات موجود حاكي از وجود اين فرضيه است كه FSH داخل فوليكول نقش مهمي در ترشح اسيد هيالورونيك بوسيلة سلول هاي گرانولوزا دارد (14) كه بتدريج با تكثير سلولهاي فوليكولي بر ميزان آنها افزوده گرديده و سپس با نزديك شدن به مراحل آخر تكامل فوليكول گيرنده هاي FSH بر سلول هاي فوليكولي نقش خود را كم رنك تر مي نمايند. سلول هايي كه مجاور مـايع فوليكولار هستند در تـرشح اسيـد هيالورونيك موجود در مايع فوليكولي، نسبت به سلول هايي كه جداي از اين مايع در لاية خارجي قرار گرفته اند، از نقش بالايي برخوردار هستند(15). مسلماً فاكتورهاي محلولي جهت رشد نهايي اووسيت ها اساسي است اين فاكتورها همراه با هورمـون FSH جهت تحريك سـاخت اسيد هيالورونيك توسط سلول هاي كومولوس مورد نياز است(16). pH مـورد نياز جهت ثبوت اتصال ماتريكس خارج سلولي سلولهاي كومولوس pH=7/0 مي باشد كه اين اتصال بدون واسطه بين ماتريكس خارج سلولي سلول هاي كومولوس و اسيد هيالورونيك رخ مي دهد(17).

از طرفـي بـا مـطالـعـه اي كه Vines و همكارانش در سال 2001 انجام دادند مشخص شد كه يك ناحية پپتيدي بنام pH-20 در اتصال هيالورونان به سلول نقش دارد. اين امر با پديدة Signaling (علامت دادن) سلول كه در طي نفوذ اسپرم به كومولوس با افـزايش كلسيم داخل اسپـرم ايجـاد مي شود، ارتباط دارد(18). مهم ترين اثر هيالورونيك اسيد روي اسپرم افزايش سرعت و حركت آنست كه حتي پس از گذشت سه ساعـت همچنان بالا باقي ميماند(19). مكانيسم افزايش تحرك اسپرم به اين ترتيب است كه هيالورونان بطور غير مستقيم از طريق افزايش فسفريلاسيون پروتئين هايي كه حاوي گيرنده هاي متصل شونده به هيالورونان هستند باعث افزايش تحرك اسپرم مي شود. وجود يك گليكوپروتئين سلولي متصل به هيالورونان بنام HABP با وزن ملكولي حدود 68 كيلو دالتون در اسپرم گونه هاي مختلف (موش، گاو و انسـان) به وسيلة آناليـز ايمونوبلاست و ايمونوفلورسانس غير مستقيم با استفاده از آنتي بادي هاي پلي كلونال نشان داده شد. اين گليكوپروتئين بر روي سر قطعة مياني و دم اسپرم در گونه هاي مختلف توزيع متفاوتي دارد. همة اين اطلاعات بوضوح نشان مي دهند كه پروتئين متصل به هيالورونان مي تواند نقش اختصاصي در بلوغ ميزان تحرك و فرآيند باروري داشته باشد(20).

مطالعات ذكر شدة فوق به همراه مطالعة حاضر مؤيد اين مطلب است كه هيالورونان تاثير بسزايي برروي افزايش تحرك اسپرم دارد. مكانيسم اثر آن روي فاكتور فوق به اين صورت است كه در سطح سلول دو گيرندة هيالورونان بنام هاي CD44 و Receptor for Hyaluronan Mediated Motality(RHAMM) وجـود دارد (21). هيالورونان با عمل متقابل خود با اين گيرنده ها و افزايش فسفوريلاسيون پروتئين هـاي اتصالـي هيالورونان ابتدا در دم اسپرم اتفاق مي افتد و در نهايت باعث افزايش كلسيم داخل سلولي مي گردد. هيالورونان عمل افزايش كلسيم داخل سلولي را در اسپرم بواسطة تاثير متقابل با گيرندة غشاء پلاسمايي pH-20 انجام مي دهد. بدين طريق كه هيالورونان متصل به گيرندة pH-20 باعث تجمع گيرندههاي زيادي در سطح نشان مي دهد كه باعث افزايش عمل آكروزم بعد از اتصال به زونا پلوسيدا مي شوند(22). مهمترين عملي كه براي گيرندة جديد هيالورونان يعنـي RHAMM موجود در سطـح

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم بيان مي شود افزايش تحرك اسپرم توسط اين گيرنده در پاسخ به هيالورونان مي باشد(23).

تقدير و تشكر

اين پژوهش با استفاده از حمايت مالي دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تهران و همكاري صميمانه پرسنل آزمايشگاه پاتولوژي بيمارستان مباشر كاشاني دانشگاه علوم پزشكي همدان خاصاً استاد گرامي جناب آقاي دكتر محمود ستاري و آقاي مهندس سيد محمد امير حسيني پناه اجرا شده است كه بدين وسيله مراتب قدر داني و تشكر خود را از نامبردگان ابراز ميداريم.

References

1) Trautman MS, Kimelman J, Bernfield M. Developmental expression of syndecan; an integral membrane proteoglycan; correlated with cell differentiation. Development 1991; 111:213-220

2) Lordish H, Baltimore D, Berk A, et al. Molecular Cell Biology. 4th ed. Scientific American Books; 2000.p: 1138-1215

3) Lord EM and Sanders LC. Role of ECM in plant development and pollination; a special case of cell movement in plant. Dev Biol 1992; 153:16-28

4) Beauvaris A, Jounean JP, Thiery M. Multiple role for integrins during development. Biology of the cell 1997; 89:5-11

5) Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, et al. Lectin histochemistry of the embryonic heat; Focuse-specific lectin binding sites in developing rats and chick. American journal of Anatomy 1989; 184:76-84

6) Chen D, McKallip RJ, Zeytun A, et al. CD44-Deficient Mice Exhibit Enhanced Hepatitis After Concavalin A injection. Evidence for involvement of CD44 in Activation induced cell death. J Immunol 2001; 166:5889-5897

7) Kano K, Miyano T, Kato S. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro matured and fertilized porcine ooytes to blastocyst stage in vitro. Biol Reprod 1998; 58(5):1226-32

8) Ilora G, Archana B, Karsturi D. Reduction in the level of hyaluronan binding protein1 (HABP1) is associated with loss of sperm motility. J Reprod Immunol 2002;53:45-54

9) Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2002.p: 163-230

10) Morgan WTJ, Watkins WM. The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. Br. J. Exp. Patol. 1959. 34:9103

11) Gony H, Freddo TF, Ye W, et al. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. Exp. Eye. Res. 1997. 64:587-595

12) Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle stimulating hormone

www.SID.ir

Archive of SID

(or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β1). J Biol Chem 1997; 272:4787-94

13) Eppig JJ. Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. Semin Dev Biol 1994; 5:51-59

14) Csaba F, Salustri A, Hascall VC. Coding sequence of a hyaluronan synthesis homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. Arch Biol Biophys 1997; 337(2): 261-266

15) Suchane KE, Simunic V, Juretic D, et al. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. Fertil Steril 1994; 62(2): 347-52

16) Salustri A, Camaioni A, Tirone E, et al. Hyaluronic acid and proteoglycan accumulation in the cumulus oophorus matrix. Ital J Anat Embryol 1995; 100(1): 479-84

17) Hirashma Y, Kobayashi H, Gtoh JT. Inter-alpha-trypsin inhibitor is concentrated in the pericellular enviroment of mouse granulose cells through hyaluronan-binding. Eur J Obster Gynecol Reprod Biol 1997; 73(1): 79-84

18) Vines CA, Li MW, Seng X, et al. Identification of a PH-20 protein that may function in cell signaling. Mol Reprod Dev 2001; 60(4):542-52

19) Meyer K, Palmer J. The polysaccharide of the vitrous humor. J Biol Chem 1934; 107:629-34

20) Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. Cell Mol Res 1995; 41(5):467-76

21) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 1990; 61:1303-1313

22) Line DY, Gordon B. Test of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58(30):465-84

23) Kornovski BS, Mecshen J, Kredenster J, et al. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan-receptor. Fertil Steril 1994; 58:599-602

www.SID.ir

Archive of SID

Role of Hyaluronan During Foliculogenesis of Mouse

Hosseinipanah M[1*]., Ahi M[2]., Habibirezaii M[3]., Hosseini M[4]., Moradi V[5]., Rajabzade A[5].

Abstract

Introduction: Hyaluronan is an extremely long glycosaminoglycan, which at variance with other glycosaminoglycans, is released into the extracellular. Both proteoglycans and hyaluronan influence many aspects of cell behavior by multiple interactions with other molecules.They synthesis change significantly during ovarian follicular development.This study was aimed to recognize of the structure of hyaluronan named glycosaminoglycans and also its alteration in different parts of follicular development during ovarian cycle.

Materials & Methods: In this study, 60 mice with race N-MARI (wt 25-30gr) were prepared from Razi Institute. After adaptation of mice to laboratory conditions and reaching the maturity age, They were used in this study. After appearance of pudenda, which indicate ovarian cycle, their ovaries, were removed and changes in hyaluronan were studied using histochemical methods. Using Alcian Blue staining, pH=3.2, the hyaluronan in prepared tissue blocks from ovarian was evaluated.

1) Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences
2) Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences
3) Dept of Biotechnology, Faculty of Sciences Tehran University
4) Dept of Statistics, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences
5) Dept of Histology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences

www.SID.ir