مجله‌دانشکده‌دامپزشکی‌دانشگاه‌تهران ،دوره‌ٔ (۴۴) شماره‌ٔ (۳) تهران (۱۳۶۸)

اثر GnRHa دررشد فولیکولهای تخمدانی موش رات نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول

دکتر رجبعلی صدرخانلو **

خـــلاصـــه

موش رات ماده نابالغ نژاد (*Sprague DawIey (SD*) در سن ۲۳–۲۱ روزه‌گی‌هیپوفیزکتومی‌شده‌ودرهمان‌زمان‌کپسول‌پلاستیکی حـــاوی *DES* جهـــت‌رشد یکدست فولیکولهای تخمدانی تا مرحله پیش انترومی ، در زیر جلد ناحیه بغل حیوان کارگذاشته شد .سه روز بعد از عمل جراحی حیوانات گروه بندی شده و هر گروه درشرایط غذائی ومحیطی مناسب‌و یکسان نگهداری گردیدندو ۲۴ ساعت بعد از نگهداری بهرگروه روزانه یکبار و بسته بنوع آزمایش ۳–۱ روز متوالی هـــورمـــون *GNRHa* و یا ســـرم فیزیولوژی (بعنوان‌گروه شاهد)تزریق گردید .مطالعه میکروسکپی تخمدان حیوانات مورد آزمایش که۲۴ساعت قبل از برداشتن تخمدان‌آنها هـــورمون *GnrHa*و یا سرم‌فیزیولوژی دریافت داشته بودند نشان داد که کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد تقسیمات میتوزی‌در بین سلولهای گرانولوزائی فولیکولهای بیش از انترومی در گروه *GnRHa* دریافت داشته در مقایسه با گروه کنترل چه در فولیکولهای سالم و یا اترتیک مشاهده میگردد . و این کاهش درتمام ابعاد فولیکولی (۴۰۰ ـ ۱۰۰ میکرومتر) محسوس است . دربررسی حداقل زمان لازم جهت تـــاثیـــر *GnRHa* در روی تعداد تقسیمات میتوزی مطالعه نشان داده است که حداقل زمان لازم جهت کاهش قابل ملاحظه در تعداد تقسیمات میتوزی ۱۶ ساعت از تزریق میباشد . بررسی اندازه اووسیت نشان داده که بعد از ۲۴ ساعت ازتزریق هیچگونه تغییر قابل ملاحظه‌ای در اندازه اووسیتهای گروههای شاهد و هورمون‌دریافت داشته مشاهده نمیگردد ولی‌چنانچه تزریق سه‌روزمتوالی ادامـــه داشتـــه باشد کاهش قابل ملاحظه‌ای بخصوص در اووسیتهای مربوط به فولیکولهای اتـــرتیـــک

---

* مقاله ارائه شده قسمتی از کارهای تحقیقاتی نویسنده درطی دوره فرصت مطالعاتی‌درمرکز تحقیقات تولید مثل دانشکده پزشکی دانشگاه سان‌دیاگوکالیفر نیامیباشد

** گروه‌علوم پایه‌دامپزشکی ،دانشکده‌دامپزشکی ،دانشگاه‌ارومیه ،ایران .

گـــروه *GnRHa* دریافت داشته بچشم میخورد نتیجه قابل توجه از تجربیات فوق‌این است که ۲۴ ساعت بعد از تزریق *GnRHa* بعلت پراکندگی سلولهای توده کومولوسی از اطراف اووسیت‌و گسیخته‌شدن پلهای‌بین‌سلولی در توده‌کومولوسی بخصوص اتصالیهای بین سلولی سلولهای تاج شعاعی با سطح اووسیت ، اووسیت تقسیم میوزی خود را از سرگرفته و ابتدا اولین‌جسم قطبی را از خود خارج ساخته و سپس بطریقه پارتنوژنز تقسیم شده و سلولهائی شبیه بلاستومررا درداخل فولیکول پیش‌انترمی ایجاد مینماید .

مقـــدمـــه

یکی از اعمال مهم هیپوفیز کنترل فعالیتهای تخمدانی چه در رابطه باعمل اگزوکربن آن یعنی آزاد سازی اووسیت وجه درارتباط با فعالیت اندوکرینی تخمدان یعنی ترشح پروژسترون ، استروژن ، پروستاگلاندینها وغیره میباشد . غده‌مذکور اعمال فوق را تحت‌تاثیر هورمون هیپوتالاموسی و با ترشح هورمونهای *FSH* و *LH* توسط سلولهای بازوفیلی خود بانجام میرساند . هورمون مترشحه از هیپوتالاموس که مسئول تحریک سلولهای مذکور میباشد بنام *GnRH* معروف است که سلولهای بازوفیلـــی ادنوهیپوفیز راوادار به‌ترشح هر دو نوع هـــورمون *FSH* و *LH* مینماید و تصورمیشود تاثیر هورمون مذکور از طریق تماس با رسپتورهای موجود در غشاء سپتوپلاسمی سلولهای هدف *Target Cells* باشد (۲۱ ، ۳۴) و احتمـــالا " *CAMP* واسطه این فعالیت میباشد (۷) درحالت نرمال *GnRH* طبیعی که بتوسط هیپوتالاموس بداخل‌سیستم باب‌پورتال هیپوتالاموهیپوفیزی ترشح میگردد هرگز بمقدار کافی که قابل تاثیر برروی سایر اندامهای هدف باشد وارد گردش خون محیطی نمیگردد زیرا غده هیپوفیز دارای ظرفیت کافی برای متابولیزه نمودن قسمت اعظم هورمون مذکوربوده و ضمنا " اندام‌های دیگری از جمله کبد ، ریه ، کلیه ، غده فوق کلیوی وماهیچه قلب دارای‌آنزیم پپتید از جهت‌تجزیه هورمون مذکور هستند (۲۲ ، ۳۵) و درنتیجه میـــزان *GNRH* درگردش خون عمومی بدن همیشه بمراتب کمتر از مقداری است که بتواند اثر خارج از هیپوفیزی داشته باشد (۱۹) پس از جدا نمودن هورمون مذکور از هیپوتالاس ـ گوسفند وخوک و مشخص شدن ساختمان شیمیائی‌آن (۸ ، ۳۸ ، ۴۶) محققین موفق به سنتزآن که بنام *GnRH analogus* معروف است شده‌اند (۴۷) بطوریکه امروزه بیش از یکصد نـــوع

انالوگ هورمون مذکور ساخته شده است که بعضا" اثراتش بمراتب بیشتـــراز *GnRH* طبیعی برروی عضو مستعد بوده و همچنین بادوام‌تر از آن نیز میباشند .

باسنتزانالوگهای متعدد از هورمون مذکور توجه بیشتری جهت‌مشخص ساختن اثـرات *GnRHa* ومکانیسم‌اثرآن در اندامهای مختلف بویژه‌دستگاه تناسلی حیوانات معطوف گشته است . قبلا"تصور میشد که هورمون مذکور تنـها از طریق تاثیر مستقیم برروی سلولـهای‌بازوفیلی هیپرفیز قدامی قادراست اعمال محرک و یا ممانعت کننده خود را اجرانمایدولی‌مطالعات‌رایپل‌وجانسون (۴۳) برای اولین بار مشخص ساخت که هورمون مذکور موجب تقلیل تاثیرهورمون *HCG* برروی رشد تخمدان‌ها و رحم موش‌رات نابالغ که هیپوفیزش برداشته‌شده‌است‌میگردد .این‌مطلب موجب گردید که افراددیگری مطالعات خود را برروی تاثیر مستقیم انالوگهای هورمون مذکور متمرکز ساخته و نشان دهنـد کـه از رشد فولیکولـهای تخمدانی در موش‌رات که هیپوفیزش برداشته‌شده است و قبلا"تحت درمـان *PmSG* قـرارگرفته بودند جلوگیری مینماید (۵۵) و در مطالعه *IN Yitro* درکشت سلولـهای گرانولوزای فولیکولـهای تخمدان موش رات درجوار *FSH* نشان داده شـد کـــه *GnRHa* از فعالیت ترشحی سلولـهای فوق ممانعت بعمل میآورد (۲۴، ۲۵، ۲۹، ۳۰) و در سلولـهای گرانولوزای‌تخمدان میمون‌نیزاثر مشابه گزارش گردید (۳۱) .مطالعات دیگر در مورد تاثیر مستقیـم *GnRHa* درسطـح تخمدانی در موش رات هیپوفیزکتومی شده چه در آزمایش برروی موجود زنده (۳۹، ۴۸، ۲۷) و چه در مطالعه درخارج ازبدن در کشت‌سلولهای گرانولوزا و لوتئالی (۶، ۱۱، ۳۶، ۳۷) موید گزارشات دیگر محققین در تاثیر منفی هورمون مذکور جهت جلوگیری از فعالیت ترشحی سلولـهای فوق‌الذکر میباشد و پیدایش گیرنده‌های مخصـــوص *GnRHa* درسلولـهای مذکور (۱۲، ۲۸) نشانگر تاثیر مستقیم و خارج از هیپوفیزی هورمون مذکوراست .

درمطالعه اخیرباتوجه باینکه‌رشدفولیکولـهای‌تخمدانی از طریق تقسیمات میتوزی و تکثیر سلولـهای فولیکولی و نیزرشد اووسیت محسوس میگردد تاثیر هورمون فوق را بر روی میزان فعالیت میتوزی سلولـهای مذکور ونیز حداقل زمان لازم جهت ظهور تغییرات مورفولوژیکی در فولیکول و رشد اووسیت موردبررسی قرارگرفت .

مـــواد وروش کـــار

موش رات نابالغ نژاد *Sprague DaWd D Iuj* در سن ۲۳ ـ۱ ۲روزگی بوسیله کمپانی جانسون (*BridVew'Illinois*)هیپوفیزکتومی شده و در همان زمان کپسول حاوی دی‌اتیل استیل بسترول (*DES*) در زیر جلد ناحیه زیر بغل حیوان کار گذاشته شد ، حیوانات پس از ۳ روز از زمان عمل تحویل آزمایشگاه گردیده و بلافاصله گروه‌بندی‌شده‌وهرگروه‌درقفسی‌جداگانه‌ای درمحل برورش حیوانات آزمایشگاهی در شرایط مناسب و تغذیه کافی نگهداری گردیدند . ۲۴ ساعت پس از نگهداری آنها به گروههای مورد آزمایش روزانه یکبار و بمدت یک الی سه روز متوالی هورمون *GnRHa* بفرمول .

(Des-GIy^{10})-D-Trp^{6}'Prȏ^{9}'ethIamde و یا بعنوان شاهد تنها سرم فیزیولوژی تزریق گردید . مقدار تزریق روزانه ۱۰۰ میکروگرم از هورمون مذکور در ۱۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی برای هر موش بصورت زیر جلدی و یا داخل صفاقی *I.p.* بود .دراینحالت فاصله زمانی جهت‌تزریق موادفوق بعنوان روزهای ۴ و۵ ویا ۶ پس‌ازعمل هیپوفیزکتومی منظور میگردد .

بسته بنوع آزمایش ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق حیوانات گروههای مختلف را بروش قطع نخاع ناحیه گردن *Cervical disIocatIon* کشته و تخمدانهای‌آنها را بلافاصله از بدن جدا و در محلول سرم فیزیولوژی سرد قرار داده . و پس از انتقال به‌آزمایشگاه با استفاده از استرئومیکروسکپ و بوسیله اسکالپل وپنس نوک‌تیز بافتهای اطرافی را ازتخمدان‌جدا ساخته و تخمدانهای پاکیزه را بمدت ۴ ساعت در محلول ثبوتی بوئن و در حرارت آزمایشگاه قرار داده و سپس نمونه‌های بافتی ثابت شده را جهت آب گیری در ظروف محتوی الکل اتیلیک با درجات صعودی شامل درجات (۷۰، ۸۰، ۹۰و دو ظرف مطلق) هریک بمدت نیم ساعت قرار داده و در مرحله بعدی بمنظور الکل‌گیری و شفاف نمودن نمونه‌های بافتی از دو ظرف گزیلل خالص هر کدام بمدت نیمساعت عبور داده وسرانجام جهت طی‌مرحله نهائی پاساژ و آغشتگی بافتها با پارابلاست ازدستگاه آغشتگی بافت با ایجاد خلاء و در حرارت ۵۸ درجه سانتیگراد بمدت نیمساعت استفاده گردید در پایان مرحله فوق‌الذکر نمونه‌های بافتی قالب گیری گردیده و با استفاده از میکروتوم‌دوار ازنمونه‌های تخمدانی برشهای‌ممتد تهیه و برروی لام حاوی چسب‌نشاسته

طوری قرار دادیم که هر اسلاید میکروسکپی حاوی سه ردیف ده تائی ومتوالی از برشها باشد تا تعقیب مقاطع میکروسکپی هر فولیکول ساده‌تر گردد . برشهای بافتی آماده شده بطریقه هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی گردیدند . توضیح اینکه بمنظور زایل نمودن رنگ بوئن از روی برشهای بافتی که خود مزاحمی جهت رنگ آمیزی بافت میباشد . پس از پارافین گیری برشها در گزیلل وآب‌دهی بافت با درجات نزولی الکل و درست قبل از وارد نمودن ظرف حاوی برشها در رنگ هماتوکسیلن اسلایدها را بمدت ۲۰ـ۱۰ ثانیه در محلول اشباع کربنات لیتیوم شستشو داده و سپس وارد رنگ هماتوکسلین مینمائیم (تجربیات شخصی) در پایان مرحله رنگ آمیزی با افزودن چسب انتلان و قرار دادن لامل بر روی لام حاوی نمونه بافتی بمطالعه میکروسکپی برشهای رنگ‌آمیزی شده میپردازیم . قابل ذکر اینکه روش استفاده از برش سریال این مزایا را به همراه دارد که میتوان هر فولیکول تخمدانی را از یک انتها تا انتهای دیگر آن مورد بررسی قرار داد تا خصوصیات شکلی فولیکولها بطور کامل مورد مطالعه قرار گیرد .در مشاهده میکروسکپی ملاک‌بررسی هر فولیکول تخمدانی با بیش از دو لایه از سلول های‌فولیکولی ومشخص ساختن بزرگترین قسمت از قطر فزلیکول و نیز مشاهده اووسیت با هستکی واضح بوده زیرا مشاهده هستک برجسته درداخل هسته اووسیت احتمال شمارش و مطالعه همان فولیکول در برشهای قبلی و بعدی را از بین میبرد . در این تجربیات میکروسکپی موراد زیر مورد بررسی قرار گرفت .

الف . اندازه‌فولیکولهابااندازه‌گیری بزرگترین قسمت‌ازفولیکول (مشاهده هستک برجسته)

ب . حالت فولیکولها (سالم یا اترتیک)

ج . اندازه اووسیت

د . تعداد تقسیمات میتوزی در بین سلولهای فولیکولی در فولیکولهای سالم واترتیک

ه . حالت اووسیت

توضیح اینکه . ۱ـ در مطالعات فوق‌الذکر مشاهده تعداد ۱۰ عدد و یا بیشتر از سلولهای فولیکولی بیکنوزه در لایه گرانولوزا همانند تجربیات گذشته (۴۵) بعنوان فولیکول تحلیل رفته محسوب میگردید و در مورد فولیکولهائی که قطر آنها کمتر از ۱۰۰ میکرومتر بوده حالت دژنراسیون اووسیتی مثل مچاله شدن هسته وکنارکشیده شدن آن از مرکز سلول وتغییر شکل حدود سلول و پرده شفاف اطرافی و نیز ایجاد حفرات پیش‌رس نیز درمحسوب نمودن فولیکولها درحال اترزی دخالت داشتند .

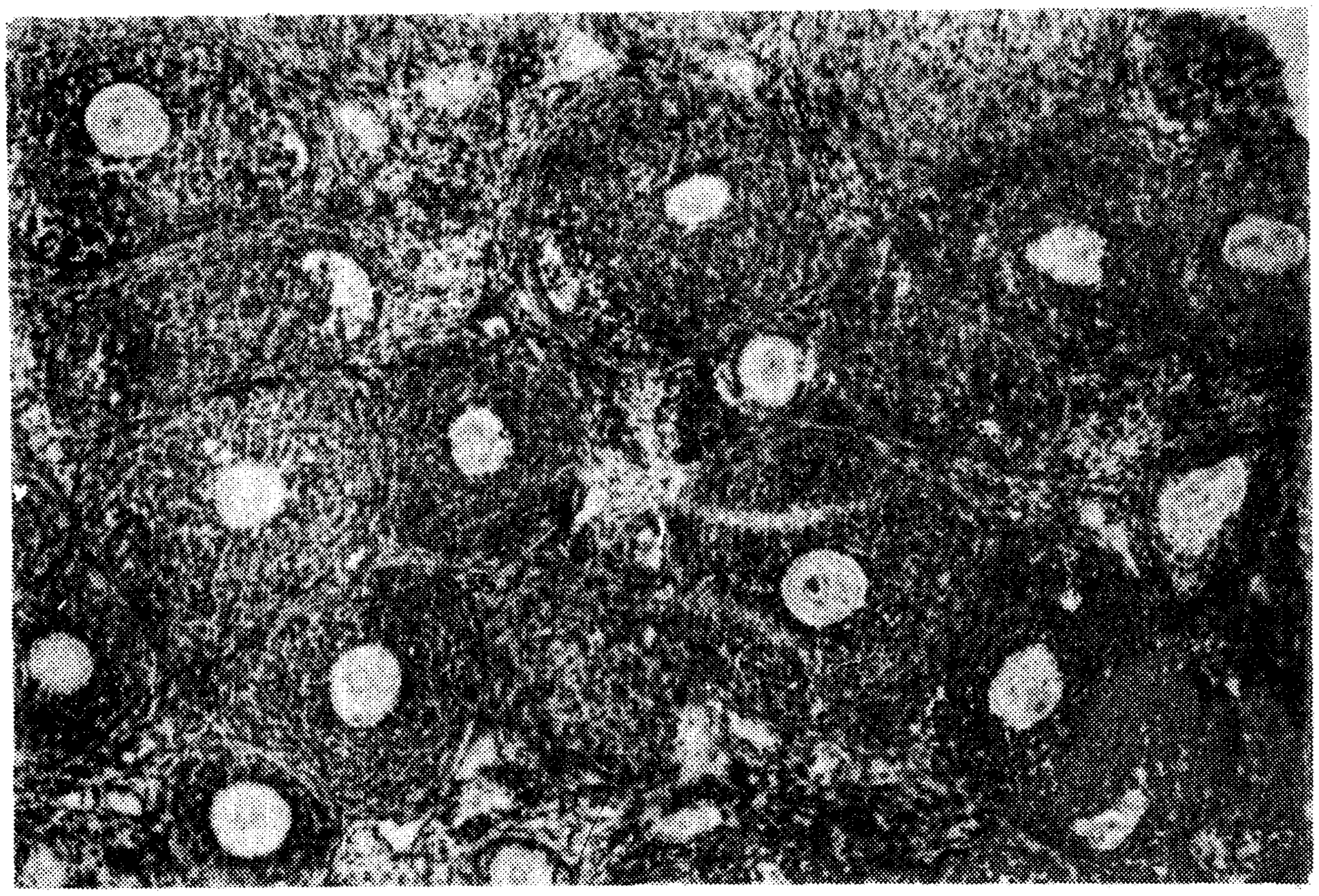
۲ــ درمورد اندازه‌گیری قطر فولیکول با استفاده از لنزچشمی مدرج از پرده بازال‌یکطرف فولیکول تا پرده‌بازال مقابل آن اندازه‌گیری میشود و در مورد فولیکولهائی که شکل کاملا" کروی نداشتند دو قطر کوچک و بزرگ آنها اندازه‌گیری ومیانگین آنها در نظر گرفته میشد .

۳ــ بمنظور بررسی عمیقتر تغییرات فولیکولی پس از اندازه‌گیری قطر تمامی آنها فولیکولها به گروه زیر ۱۰۰ میکرومتر و بین ۲۰۰ ــ ۱۰۰ و ۳۰۰ ــ ۲۰۰ و ۴۰۰ ــ۳۰۰ میکرومتر تقسیم بندی گردیدند .

نتیجه

برداشتن هیپوفیز در حیوانات مورد آزمایش بمنظور حذف هورمونهای FSH و ومشاهده تاثیر مستقیم هورمون $GnRHa$ برروی رشد تخمدان است . و قرار دادن کپسول حاوی دی‌اتیل استیل بسترول موجب رشد یکدست فولیکولهای تخمدانی تا مرحله پیش انترومی میگردد (شکل ۱) .

به گروههای مورد آزمایش از طریق داخل صفاقی و یا زیر جلدی $GnRHa$ و یا سرم فیزیولوژی (گروه کنترل) تزریق گردیدو از مطالعات میکروسکپی برشهای‌ممتد تخمدانی نتایج زیرحاصل گردید .



شکل ۱ ــ نمایانگر برش بافتی از تخمدان موشهای نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول دی‌اتیل استیل بسترول ، ۵ روز بعد از عمل هیپوفیزکتومی است علیرغم برداشتن هیپوفیز حیوان وتنها تحت تاثیر *DES* فولیکولهای تخمدانی بطور یکدست تا مرحله پیش انترومی رشدنموده‌اند . رنگ آمیزی هماتوکسلین وائوزین ۸۶×

الف . تاثیر *GnRHa* درمیزان فعالیت تقسیمات میتوزی در سلولهای گرانولوزائی تخمدان

نتایج مطالعه میکروسکپی برشهای بافتی از تخمدان حیواناتیکه ۲۴ ساعت قبل از برداشتن تخمدان : هورمون *GnRHa* و یا سرم فیزیولوژی دریافت داشته اند ، همانطوریکه در جدول شماره (۱) ثبت گردیده نمایانگر تغییرات قابل ملاحظه درکاهش تعداد تقسیمات میتوزی چه در مقایسه با فولیکولهای سالم در دو گروه شاهد وهورمون دریافت داشته و چه در فولیکولهای درحال تحلیل میباشد . از آنجائیکه با افزایش قطر فولیکولها تعداد سلولهای فولیکولی اطراف اووسیت نیز افزوده میگردد بالطبع تعداد تقسیمات میتوزی که در یک برش تخمدانی مشاهده میشود با افزایش قطر فولیکول نسبت مستقیم دارد .در فولیکولهای اترتیک بعلت اختلال در ساختمان فولیکولی تقسیم سلولی نسبت به فولیکول سالم کاهش بیشتری را نشان میدهد بخصوص .درگروه *GnRHa* دریافت داشته که تقسیمات میتوزی بحداقل ممکن تقلیل مییابد .

ب . تاثیر *GnRHa* برروی تعداد تقسیم میتوزی در سلولهای گرانولوزای تخمدان درزمانهائی مختلف

تزریق هورمون *GnRHa* بمقدار ۱۰۰میکروگرم و برداشتن تخمدان حیوانات موردآزمایش درزمانهای مختلف نشان داده است که۸ ساعت پس از تزریق هورمون مذکور کاهش‌چشمگیری درتعداد تقسیمات میتوزی بوجود نمیآورد ولی مطالعه میکروسکپی تخمدانهائی که بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت از تزریق هورمون از بدن حیوان جداگردیدند کاهش زیادی را در تعداد تقسیم میتوزی بخصوص در فولیکولهای با ابعاد ۴۰۰ـ۲۰۰ میکرومتر نشان میدهد . نگاهی به نمودار شماره (۱) گویای این مطلب است که تقسیم سلولی در گروههای *GnRHa* دریافت داشته بعد از ۱۶ ساعت از تزریق تا ۴۰% و پس از ۲۴ ساعت از تزریق ۶۵% نسبت به فولیکولهای گروه کنترل کاهش در فعالیت تقسیمات میتوزی داشته است .

ج . تاثیر *GnRHa* برروی رشد اووسیتها

مطالعه میکروسکپی تخمدان موشهائی که سه روز متوالی بمقدار ۱۰۰ میکروگرم در روز *GnRHa* دریافت داشته‌اند .مقایسه‌آنها با گروههای کنترل که تنها در هر تزریق مشابه سرم فیزیولوژی دریافت نموده‌اند نشان میدهد که اندازه اووسیتها در اثر

تزریق متوالی هورمون به حیوان در کل کاهش قابل ملاحظه ای یافته و این کاهش اندازه بخصوص درفولیکولهای بابعاد بیشتر (۴۰۰ ــ ۳۰۰ میکرون) محسوس تراست و مطالعه فولیکولهای سالم و اترتیک تخمدان نشان میدهد اولا" اندازه اووسیت در دو نوع فولیکول‌مذکور (سالم واترتیک) درگروه‌کنترل با هم متفاوت است ودرثانی این اختلاف در اووسیت‌فولیکولهای اترتیک تخمدانی مربوط به گروه *GnRHa* دریافت داشته بیشتر است ولی فولیکولهای سالم دوگروه کنترل و *GnRH* دریافت داشته اگر چه اختلاف جزئی در اندازه نشان میدهند ولی قابل ملاحظه *Significant* نمیباشد، نمودار شماره (۲) .

لازم بتوضیح است که اختلاف اندازه فوق الذکر تنها در حیوانا تیکه سه روز متوالی هورمون *GnRHa* دریافت داشته‌اند مشاهده گردید . و در آزمایشات مشابه‌ای که‌روی حیوانات گروههای دیگر صورت گرفت با یکبارتزریق ۱۰۰ میکروگرمی وبرداشتن تخمدانهابعداز ۴۸ و ۷۲ساعت‌از تزریق هیچگونه اندازه قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید و اندازه اووسیتها تقریبا" در سطح گروههای کنترل‌بود .

د . تاثیر *GnRHa* درساختمان‌بافتی‌توده‌کومولوسی (اووسیت + سلولهای‌فولیکولی اطراف‌آن) .

مطالعه میکروسکپی فولیکولهای اترتیک درگروه شاهد آشکار ساخته است که در اینوع‌فولیکولهاعلائم‌تحلیل وآشکار شدن سلولهای نکروبیوزی با هسته‌ای پیکنوزه اغلب در زیر لایه‌بازال‌سلولهای‌گرانولوزائی‌ظاهر میگردد و توده کومولوسی و بخصوص سلولهای تاج شعاعی کاملا" اووسیت را احاطه نموده و ارتباط بین سلولی خود را با سطح اووسیت حفظ مینماید . (شکل *A* ــ۲) حال آنکه درگروه *GnRHa* دریافت داشته سلولهای فوق‌الذکر ازاطراف اووسیت متفرق گشته و ارتباط خودرا با اووسیت تقریبا" قطع مینمایند (شکل *B* ــ۲ و *A*- ۳) ودراثرگسیختگی ارتباط مذکوراووسیت بتدریج تقسیم میتوزی را باتمام رسانیده و ابتدا گریچه قطبی را از خود خارج ساخته . (شکل *B* ــ ۳) و سپس بطریقه‌پارتنوژنزشکافته‌شده‌و سلولهای شبیه بلاستومر را بوجود میآورد (شکل *B*- ۳) بطوریکه بعدازسه روزازتزریق ، هورمون *GnRHa* توده سلولی مشابه مرولا درداخل فولیکول‌پیش‌از انترومی ظاهرمیگردد . (شکل *D*ــ۳)

بحـــث

نتایج بدست آمده نشان میدهد که هورمون *GnRHa* موجب تقلیل فعالیت تقسیمات میتوزی دربین سلولهای گرانولوزائی و در نتیجه ممانعت از رشد فولیکولهای تخمدانی در موش رات نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول *DES* میگردد. و این نتایج تائید مجددی است برگزارشات متعددی که در رابطه با تاثیر انالوگهای *GnRH* درجلوگیری از رشد فولیکولهای تخمدانی و سایر اعضاء تناسلی وفونکسیون آنهاتوسط محققین مختلف بیان گردیده است (۵، ۲۶، ۴۴، ۵۵). درمورد نحوه‌تاثیر *GnRH* در ممانعت از رشد فولیکوکهای تخمدانی متعاقب گزارش را ییپل‌وجانسون در سال ۱۹۷۶ (۴۳) دربارهٔ اثر این هورمون در مهار اثر تحریکی *HCG* برروی رشد تخمدان‌و رحم‌در موش رات‌نابالغ هیپوفیزکتومی‌شده و اظهار نظر اینکه مطالعات‌بیشتری لازم است در آینده صورت گیرد تا نحوهٔ تاثیر هورمون را در اندام تناسلی بررسی و مشخص سازد که‌آیا هورمون از طریق ذخالت دادن سایر غدد اندوکرینی مثل جسم ابی فیزی‌ویاغده‌فوق‌کلیوی اعمال اثر میکند و یا اینکه خود مستقیما" بروی بافت تخمدانی تاثیر میگذارد. بدلیل فوق و بمنظور نیل به این هدف مطالعات متعددی بااستفاده از کشت سلولهای گرانولوزا فولیکولهای پیش انترومی تخمدان موش رات‌نابالغ و افزودن *FSH* بمحیط‌کشت فوق‌الذکرصورت گرفته و تاثیر محرکه هورمون را در فعال ساختن سلولهای گرانولوزائی به سنتز و ترشح هورمونهای استروژن و پروژسترون روشن‌ساختند (۳، ۱۳، ۱۶، ۴۰) و متعاقب آن با استفاده ازمدل کشت‌فوق‌الذکروافزودن *GnRHa* به‌کشت سلولی مذکور تاثیر مستقیم و مهارکننده هورمون فوق برروی فعالیت ترشحی سلولهای گرانولوزائی متاثراز *FSH* ثابت گردید (۲۴) و مطالعات بعدی روشن ساخت که درسطح سلولهای گرانولوزائی موش رات و رسپتور ویژه‌ای جهت *GnRHa* وجود دارد (۳۲، ۴۲). در مطالعه اخیر مشاهده گردید که انالوگ *GnRH* مورد استفاده قادراست در توده کومولوسی یکنوع حالت پخش و گسیختگی ایجاد نموده و ارتباط سلولهای تاج پره‌ای را از اووسیت قطع نماید و این موافق باگزارشی است که *GnRHa* از ایجاد اتصالیهای بین سلولی‌بوسیله *FSH* درسلولهای گرانولوزائی ممانعت بعمل میآورد (۱).

از دیگر نتایج حاصله کاهش اندازه اووسیت در اثر تزریق سه روز متوالی *GnRHa* میباشد. که احتمالا" در اثر اختلال در ارتباط بین سلولهای کومولوسی وعدم دسترسی اووسیت در حال رشد بمواد غذائی کافی می‌باشد زیرا لازمه رشد اووسیت‌وجود موادی است که توسط سلولهای فولیکولی اطراف آن و از طریق پلهای بین سلولی در دسترس آن قرار میگیرد (۴۹). قابل توجه اینکه در گروههای مورد آزمایشی که تنها یکبار تزریق *GnRHa* دریافت ، داشته و تخمدانهای آنها بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان تزریق برداشته ومورد آزمایش میکروسکپی قرار گرفتند چنین کاهش اندازه اووسیتی مشاهده نگردید و این نشانگر آن است که کاهش قابل توجه اندازه اووسیت به درمان طولانی تری نیازمند است .

درمورد از سرگیری تقسیمات میوزی و شکافتگی اووسیت همانطوریکه در تصویر شماره۳ مشهود است اینحالت تنها درفولیکولهای اترتیک‌تخمدانی و نیز بعد از پراکنده شدن سلولهای توده کومولوسی از اطراف اووسیت ظاهر میگردد و ضمنا" این فعالیت میوزی کلیه اووسیتهای موجود در فولیکولهای اترتیک و بابعاد مختلف را در برنمیگیرد و غالبا" شامل فولیکوکلهای تخمدانی‌بابعاد ۴۰۰ــ ۲۰۰ میکرون میباشد (آمار و مدارک لازم طی مقاله جداگانه‌ای ارائه خواهدشد) و این موید گزارشات متعدد در رابطه با تاثیر *GnRHa* دراز سرگیری تقسیمات میوزی اووسیت در فولیکول‌های پیش انترومی تخمدان موش‌رات نابالغ هیپوفیزکتومی شده میباشد (۴، ۱۷۱۵، ۱۸، ۲۳) دراین رابطه بنظرمیرسد یکنوع ارتباط و کنترلی بین اووسیت و سلولهای فولیکولی اطرافی وجوددارد (۲، ۹، ۲۰، ۵۰) و مادامیکه این فاکتور موجود است اووسیت درمرحله دیپلوتن (دیکتیوتن) قرار داشته و بمحض قطع این ارتباط و رهائی اووسیت از کنترل عامل مهار کننده تقسیم رسیدگی سلول مذکور از سرگرفته میشود و دراین رابطه محققین مختلف‌طی گزارشاتی نشان داده‌اند که از سلول های گرانولوزائی فولیکولهای تخمدانی ماده ممانعت کننده از تقسیم رسیدگی اووسیت ترشح میگردد و جهت تائید این مطلب اووسیتها را از فولیکولهای متوسط و بزرگ تخمدانی جدا نموده و در محیط‌کشت مناسب قرار داده و سلول‌های‌مذکورفعالیت تقسیم رسیدگی خود را از سرگرفتند وحال آنکه در شرایط طبیعی و در *In YiYo* این سلولهادرحالت دیکتیوتن باقی میمانند (۱۰، ۳۳، ۵۱، ۵۳) و در تجربیات بعدی با اضافه نمودن مایع فولیکولی خوک ،انسان و گاو بمحیط کشت اووسیتهای موش رات نهفته شده در توده کومولوسی اثر مهار مایع فولیکولی در تقسیم

میبوزی نشان داده شده است . (۴۱ ، ۵۲) ووجود فاکتور ممانعت کننده میبوز *OMI* را در مایع فولیکولی پیشنهاد نمودند . تحقیقات دیگر هیپوگرانتین‌موجود در مایع فولیکولی را که توسط سلولهای گرانولوزائی فولیکولهای تخمدانی ترشح میگردد . عامل اصلی در ممانعت‌از رشد اووسیت میدانند (۱۴ ، ۴۱) لازم بذکر است که *OMI* موجود درمایع فولیکولی دارای تاثیر مستقیم برروی اووسیت نبوده . بلکه بطور غیر مستقیم از طریق تداخل با سلولهای تاج شعاعی توده کومولوسی اعمال نفوذ می‌نماید (۵۳)و تصور میشود فاکتور مذکور بعنوان اشاره کننده به سلولهای توده کومولوسی در تولید *CAMP* عمل نماید که ماده اخیر از طریق پلهای بین سلولی بداخل اووسیت‌انتقال میبابد (۵۳) با توجه بمطالب فوق و اینکه احتمالا" تحت‌تاثیر *GnRHa* پلهای بین سلولی توده کومولوسی گسیخته وارتباط سلولهای تاج‌پره‌ای با سطح اووسیت قطع میگردد تصویر شماره *B* ـ ۲ و *A* ـ ۳ دیگر *CAMP* قادر به انتقال بداخل اووسیت نبوده و بتدریج سطح *CAMP* اووسیت کاهش یافته که خود منجر به آزاد شدن کلسیم ذخیره‌داخل سلولی و متعاقب آن شروع تقسیمات میبوزی میگردد (۵۴) . و نظر باینکه از سرگیری میبوز مشمول اووسیتهای موجود در فولیکولهای اترتیک میباشد . کاهش تولید در اثرمرگ سلولهای گرانولوزائی و پیروآن کاهش تولید *CAMP* بوسیله سلول‌های توده کومولوسی را نیز میتوان از دیگر عوامل شروع تقسیمات رسیدگی اووسیت دانست .

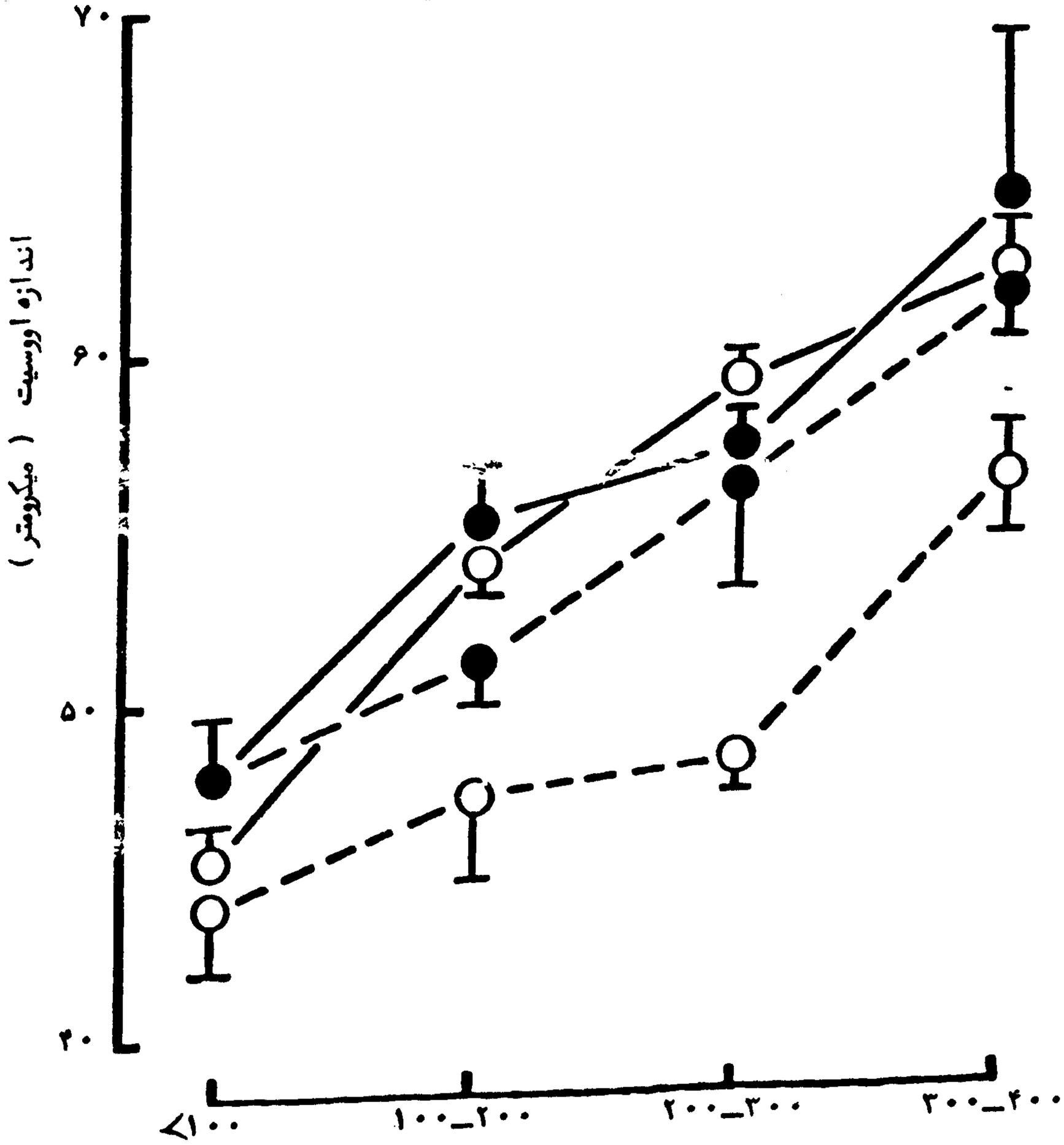
تشکر :

بدینوسیله از آقایان بهروز فتحی و عمادچنگیزی که‌بترتیب‌درتهیه نمودارها و تصاویر با اینجانب‌همکاری نموده اند و بخصوص خانم کنار یک بیت‌گر که در تایپ‌مقاله زحمات زیادی را متحمل شده‌اند صمیمانه تشکروقدردانی مینماید .

OMI=OoCyte Maturation inhibitor.

CAMP=CycIiC abenosine 3'-5'monoPhosPhete.

GnRH=GonabotroPin-ReIeasiny hormone.



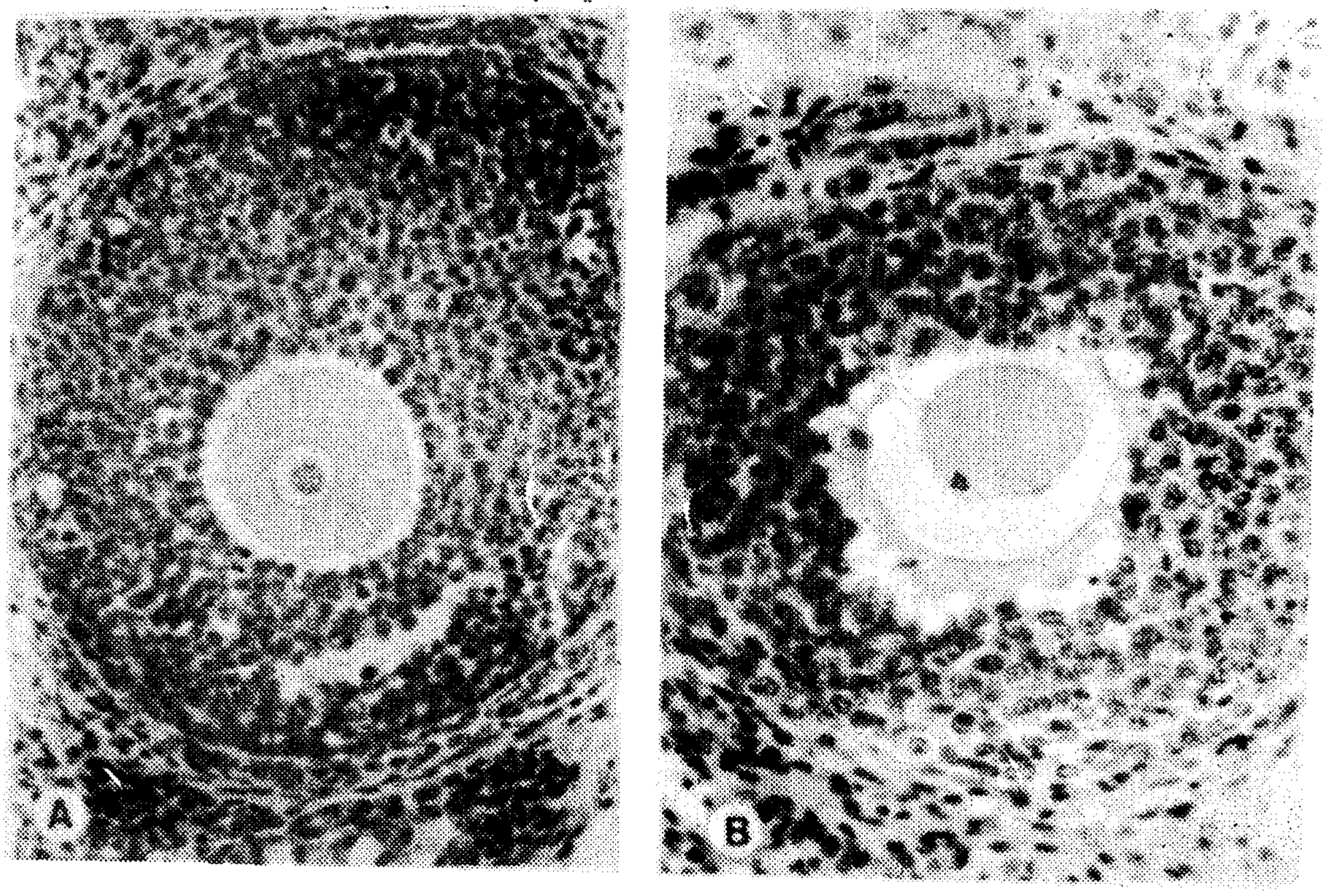
نمودار شماره ۲ـ میانگین اندازه اووسیتها را باتوجه به ابعاد فولیکولهای تخمدانی در موش رات نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول *DES* نشان میدهد که بمدت سه‌روز متوالی هورمون *GnRHa* بمقدار ۱۰۰ میکروگرم در روز دریافت‌داشته و ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق تخمدان آنها مورد آزمایش میکروسکوپی قرارگرفت

(●—●) اندازه اووسیت در فولیکولهای سالم گروه کنترل

(○—○) اندازه اووسیت در فولیکولهای سالم گروه *GnRHa* دریافت داشته

(●- -●) اندازه اووسیت در فولیکولهای اترتیک گروه کنترل

(○- -○) اندازه اووسیت در فولیکولهای اترتیک گروه *GnRHa* دریافت دریافت‌داشته

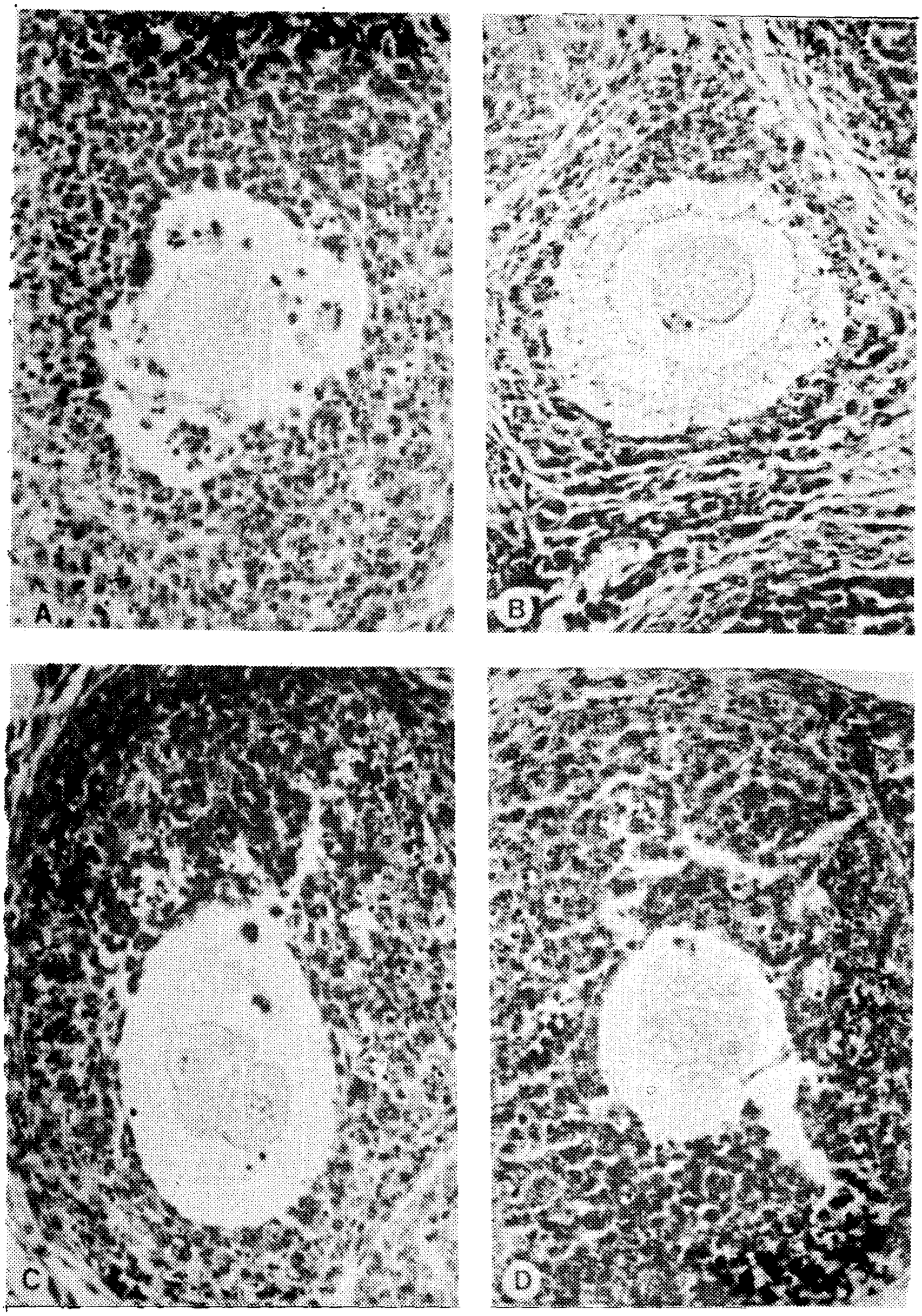


تصویرشماره ۲

تصویر (A ـ۲) منظره‌ای است از یک‌فولیکول پیش‌انترومی‌درحال تحلیل و با بیش از ده هسته فشرده (Pyknotic) در قسمت محیطی در لایه گرانولوزای تخمدان موش گروه کنترل‌بنحوه مرتب‌شدن سلولهای تاج شعاعی در اطراف اووسیت توجه شود . سلولهای‌فولیکولی‌کاملا "اووسیت‌را در برگرفته‌اند و حال آنکه درحالت فولیکولهای اترتیک تخمدانهای متاثراز GnRHa این سلولها از اووسیت دور میگردند . تصویر (ـ۲) رنگ آمیزی هماتوگسیلین وائوزین ۲۰۰×

جدول شماره ۱ نشان دهنده تعداد تقسیمات میتوزی در بزرگترین زمقطع فولیکولهای پیش از انتروپی سالم و تحلیل رفته *Atretic* در تخمدان موش راست تا بالغ هیپوفیزیکی شده حاوی کپسول *DES* در گروه کنترل و حیوانات تیکه ۲۴ ساعت قبل ازکشتن به هر یک ۱۰۰ میکروگرم هورمون *GnRHa* تزریق گردیده است .

گروه مورد آزمایش	تعداد تقسیمات میتوزی در فولیکولهای بابعاد کمتر از ۱۰۰ میکرومتر *Mean±SEM*	تعداد تقسیمات میتوزی در فولیکولهای بابعاد بین ۲۰۰ـ۱۰۰ میکرومتر *Mean±SEM*	تعداد تقسیمات میتوزی در فولیکولهای بابعاد بین ۳۰۰ـ۲۰۰ میکرومتر *Mean±SEM*	تعداد تقسیمات میتوزی در فولیکولهای بابعاد بین ۴۰۰ـ۳۰۰ میکرومتر *Mean±SEM*
گروه کنترل (فولیکولهای سالم)	۰/۷ ± ۰/۱	۲/۱ ± ۰/۲	۸/۸ ± ۱/۵	۱۳/۵ ± ۱
گروه *GnRHa* تزریق شده (فولیکولهای سالم)	۰/۱ ± ۰/۰۶	۰/۶ ± ۰/۰۶	۳/۹ ± ۰/۶	۵/۱ ± ۰/۷
گروه کنترل (فولیکولهای تحلیل رفته)	۰	۰/۳۵ ± ۰/۰۶	۲/۳ ± ۰/۱	۳/۷ ± ۰/۵
گروه *GnRHa* تزریق شده (فولیکولهای تحلیل رفته)	۰	۰/۲ ± ۰/۰۴	۰/۴۵ ± ۰/۱۵	۱ ± ۰/۱



تصویر شماره ۲ــ قطع بلهای بین سلولی د رتوده کومولوسی موجب پراکنده شدن سلولهای فولیکولی از اطراف اووسیت میگردد (شکل A) متعاقب آن تقسیم میوزی اووسیت از سر گرفته شده و د ر نتیجه گویچه قطبی آزاد میگردد (شکل B) سپس اووسیت بطریقه پارتنوژنز تقسیم شده و سلولهای شبیه بلاستومرا را ایجاد مینماید (شکل C) و ادامه تقسیمات شکافتگی منجر به تشکیل توده سلولی شبیه مرولا د ر د اخل فولیکول پیش انتروی میگردد (شکل D) رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین ۲۰۰×

51- Tsafriri, A., Pomerantz, S.H., and Channing, C.P. 1976: Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: Partial characterization of the inhibitor: Biol. Reprod. 14: 511-516.

52- Tsafriri, A. 1979: Mammalian oocyte maturation model systems and their physiological relevance: In:Ovarian and corpus luteum fuction. Eds by C.P. Channing.J., Marsh. and W.J. Sadler. Plenum press New York PP: 269-281.

53- Tsafriri, A., Dekel, N., and Bar-Ami, S. 1982: The role of oocyte maturation inhibitor in the follicular regulation of oocyte maturation. J.Reprod. Fertil. 64: 541-551.

54- Whittingham, D.G. and Siracusa, G. 1978: The involvment of calcium in the activation of mammalian oocytes. Exp. Cell. Res. 113: 311-317.

55- Ying, S.Y., and Guillemin, R. 1979: ($D\text{-}Trp^{6}\text{-}Pro^{9}\text{-}NEt$) Luteinizinghhormone-releasing factor inhibits follicular development in hypophysectomized rats. Nature. 280: 593-595.

45- Sadrkhanloo, R., Hafeditz, C. and Erickson, G.F. 1987: Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized eserogen treated rat. Endocrinology.120: 146-155.

46- Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo,H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M.G., Debeljuk,L., and White, W.F. 1971: Gonadotropin releasing hormone, one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormone. Science. 173:1300-1308.

47- Schally, A.V., Arimura, A., Carter, W.H., Redding, T.W., Geiger, R. Koning, W., Wissman, H., Jaeger, G., Sandow, I., Yanaihara, N., Yanaihara, C.,Yoshimoto, T., and Sakagani, M. 1972: LH-releasing hormone activity of some synthetic polypeptide. fragments shorter than decapeptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 366-375.

48- Sequin, C., Reeves, J.J., Lefebvre, F.A. and Labrie, F. 1980, Direct effects of an LHRH agonist on the rat ovary and testis in: Pro. 62nd annual meeting of the endocrine society. Washington, D.C. (Abstr).

49- Sheriden, J.D.1971: Dye movement and low resistance junction between reaggregated embryonic cells Dev. Biol. 26: 627-636.

50- Szollosi, D., Gerard, M., Menezo, Y. and Thibault, C. 1978: Permeability of ovarian follicle: Corona cell-oocyte relationship in mammals. Ann. Biol.Anim. Biochem. Biophys. 18: 511-521.

39- Mayer, M.Q., Tarnavsky, G.K. and Reeves, J.J. 1979: Ovarian growth and uptake of iodinated ($D\text{-}Leu^{6}$)LHRH-EA inHCG- treated rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161: 216-219.

40- Nimrod, A., and Lindner, H.R. 1976: A synergestic effect of androgen on the stimulation of progesterone secretion by FSH in cultured rat granulosa cell.Mol. Cell. Endocrinology. 15: 315-320.

41- Pomeratz, S.H., Channing, C.P. and Tsafriri, A.1979: Studies on the purification and action of an oocyte maturation inhibitor isolated from porcine follicular fluid. In: Peptides. Structure and biological function. E.Gross and J, Meinhofer, Eds. Pierce.Chemical company. Rockford. Il.

42- Reeves, J,J., Seguin, C., Lefebvre, F.A., Kelly, P.A. and Labrie, J.J. 1980: Similar luteinizing hormone releasing hormone binding sties in rat anterior pituitary and ovary. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 5567-5571.

43- Rippel, R.H. and Johnson , E.S. 1976: Inhibition of HCG induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152: 432-436.

44- Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W. 1978: Chronic effects of ($D\text{-}Trp^{6}\text{-}Pro^{9}\text{-}NEt$) luteinizing hormone-releasing factor on reproductive processes in the female rat. Endocrinology. 103: 2299-2305.

Press. New York. 147: 211-222.

33- Leibfried, L. and First, N.L. 1980: Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. Biol. Reprod. 23: 679-704.

34- Marshal, J.C. and Odell, W.D. 1975: Preparation of biologically active ^{125}I LHRH suitable for membrane binding studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149:351-355.

35- Marshal, J.C., Shakespear, R.A. and Odell, W.D.1976: Pituitary plasma membrane-luteinizing hormone releasing hormone binding: Evidence for the presence of specific binding sites in other tissue. J. Endocrinology. 64: 38.

36- Massicotte, J., Veilleux, R., Lavoie, M. and Labrie, F. 1980: An LHRH agonist inhibits FSH-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in porcine granulosa cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 1362-1366.

37- Massicotte, J., Borgus, J.P., Lachance, R. and Labrie, F. 1981: Inhibition of HCG. induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by LHRH agonist. J. Steroid. Biochem. 14: 239-242.

38- Matsuo, H., Baby, Y., Nair, P.M.G., Arimura, A. and Schally, A.V. 1971: Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. the propose amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 1334-1339.

rats. Contraception. 14: 625.

27- Jones, P.B.C. and Hsueh, A.J.W. 1980: Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. Endocrinology. 107: 1930-1936.

28- Jones, P.B.C., Conn, P.M., Marian, J. and Hsueh, A. J.W. 1980: Binding of gonadotropin-releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. Life Sci. 27: 2125-2132.

29- Jones, P.B.C. and Hsueh, A.J. W. 1981: Direct effects of gonadotropin releasing hormone and its antagonist upon ovarian functions stimulated by FSH, Prolactin and LH. Biol. Reprod. 24: 747-759.

30- Jones, P.B.C. and Hsueh, A.J.W. 1983: Modulation of steroidogenic enzymes by gonadotropin releasing hormone in cultured granulosa cells. in: Factor regulating ovarian function. edited by Greenwald, G.S. and Terranova, P.F. Raven Press, New York. pp 273-279.

31- Knecht, M., Ranta, T., Naor, Z. and Catt, K.J. 1983: Direct effect of GnRH on the Ovary. In: Factors regulating ovarian function. Edited by Greenwald, G.S. and Terranova, P.F. Raven. Press. New York.pp 225-243.

32- Labrie, F., Seguin, C., Lefebvre, F.A., Massicotte, G.P., Burgus, J.P., Kelly, P.A., Reeves, J.J. and Belanger, A. 1982: Intraovarian action of GnRH. In: Advances in experimental medicine and biology.Edited by Cornelia, P.Channing and Sheldons. Segal. Plenum

20- Gilula, N.B., Epstein, M.L. and Beers, W.H. 1978: Cell to cell communication and ovulation: A Studyof the cumulus-oocyte complex. J.Cell. Biol. 78: 58-75.

21- Grant, G., Vale, W. and Rivier, J. 1973: Pituitary binding sites for H^3-labelled luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Biochem. Biophys.Res.Commun. 50: 771-778.

22- Herber, D., Marshall, J.C. and Odell, W.D. 1978: GnRH membrane binding identification. specificity and quantification in nonpituitary tissues. Am. J. Physiol. 235. E227.

23- Hillensjo, T. and Lemaire, W.J. 1980: Gonadotropin releasing hormone agonist stimulate meiotic maturation in follicle-enclosed rat oocytes in vitro.Nature. 287: 145-146.

24- Hsueh, A.J. W. and Erickson, G.F. 1979: Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone. Direct inhibition of ovarian steroidogenesis. Science. 204: 854-855.

25- Hsueh, A.J.W., Wang, C. and Erickson, G.F. 1980: Direct inhibitory effect of gonadotropin releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptors and aromatase activity in rat granulosa cells. Endocrinology. 106: 1697-1705.

26- Humphrey, R.R., Windsor, B.L., Bousley, F.G. and Edgren, R.A. 1976: Antifertility effect of an analog of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in