

نقش ارتباطات بین سلولی در القای گیرنده LH در موش رات

دکتر حمیدرضا صادقی پور رودسری، استادیار دانشکده پزشکی گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Role of Intercellular Communication on LH Receptor Induction in Rat

SUMMARY

The cyclical changes in the gonadotropins stimulate ovarian follicular development either to the ovulatory stage or to undergo atresia. One such intrafollicular factor may be intercellular communication via gap junctions. We have examined the effects of two agents (retinoids and alkanols), known to disrupt or uncouple gap junction, on FSH-stimulated LH receptor induction and progesterone synthesis in granulosa cells.

Granulosa cells from diethylstilbestrol-treated immature rats were isolated and cultured in serum-free medium containing either FSH (15 ng/ml) or FSH and estradiol (30 nM), various doses (0.1-1000 nM) of either retinoic acid were added to the cultures at the time of seeding. Additional cultures containing the same concentrations of either FSH, or FSH and estradiol, were treated with 0.01-10 nM heptanol or octanol. The results of this study showed that:

- 1) Retinol, at all of the concentrations tested, had no effect on either FSH-stimulated LH receptor induction or progesterone accumulation by the granulosa cells.
- 2) Retinoic acid suppressed both LH receptor induction and progesterone accumulation by the cells.
- 3) Heptanol and octanol suppressed LH receptor induction but did not have inhibitory effect on the progesterone accumulation.

خلاصه

اعمال تخمدانها تحت اثر هورمونها و فاکتورهای مختلفی قرار دارد که مجموعه این عوامل سبب می شود که در هر ماه

تعدادی از فولیکولها رشد کرده و به غیر از یکی، بقیه از بین بروند از جمله عوامل مؤثر در این پدیده تکاملی، احتمالاً ارتباطات شکافی (gap junction) بین سلولهای گرانولوزا

می‌دهد که مولکولهای کوچک از جمله cAMP از یک سلول به سلول مجاور انتقال یابد (۲).

مابه منظور بررسی نقش فیزیولوژیک این اتصالات شکافی بین سلولهای گرانولوزا در روند تکاملی و تمایز آنها، اثر دو نوع ماده‌ای را که مشخص گردیده می‌توانند این ارتباطات را قطع نمایند، یعنی رتینوئیدها (Retinoids) و آلکانول (Alkanol) (۳، ۴) بر روی القای گیرنده LH و تولید پروژسترون، مورد مطالعه قرار دادیم. بدیهی است توانایی یک الکل برای از بین بردن اتصالات شکافی بستگی به طول زنجیر آلکیل‌کننده آن داشته که در این میان هپتانول (Heptanol) و اکتانول (Octanol) از قدرت بیشتری برخوردار هستند.

موارد و روشها

موشهای استفاده شده در این آزمایش، ۲۲ روزه، ماده و از نژاد Sprague Dawley بوده که در شرایط درجه حرارت ۲۴ درجه سانتیگراد، ۱۴ ساعت روشنایی در شبانه‌روز قرار داشته و غذا و آب به مقدار کافی در اختیار آنها قرار گرفته بود. در زیر جلد آنها DES (Diethylstilbestrol) که داخل لوله‌های پلاستیکی بطول ۳ سانتیمتر قرار داشت، بمدت ۷۲ ساعت کاشته شده، بتدریج جذب گردد.

طرز تهیه سلولهای گرانولوزا

پس از کشتن موشها با گیوتین، بلافاصله هر دو تخمدان جدا و سپس چربیهای اطراف آنها را جدا کرده و در داخل ظروف کشت سلولی که محتوی HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) بودند گذاشتیم. آنگاه با سر سوزن استریل نمره ۲۶ سوراخهای زیادی در روی تخمدانها ایجاد نمودیم، تا به این وسیله سلولهای گرانولوزا از تخمدان خارج شوند. سپس این سلولها را به لوله‌های پلاستیکی استریل منتقل و بعد از دوبار شستشو با HBSS بمدت کوتاه تحت اثر تریپسین و DNAase قرار دادیم تا سلولهای مرده خارج شده و محصولی که حدود ۸۵-۸۰٪

می‌باشد. ما در این آزمایشات اثرات دو ماده‌ای که مشخص گردیده می‌توانند این ارتباطات را از بین ببرند، یعنی رتینوئیدها و آلکانولها در القای گیرنده LH (receptor) و تولید پروژسترون بوسیله FSH را مورد مطالعه قرار دادیم. موشهای رات نابالغ را بمدت ۷۲ ساعت بصورت کاشتن در زیر جلد تحت اثر دی‌انیل‌استیل‌یسترول قرار دادیم، سپس به تهیه سلولهای گرانولوزا از فولیکولهای تخمدانی آنها که در مرحله preantral follicle قرار داشتند اقدام نموده و سلولها را بمدت سه روز در انکوباتور (incubator) تحت اثر ۱۵ نانوگرم FSH قرار دادیم که در این زمان سلولها در مجاورت رتینوئیک اسید، رتینول یا غلظتهای ۰/۱ - ۱۰۰۰ نانومولار و هپتانول یا اکتانول با غلظتهای ۰/۱ - ۱۰ میلی‌مولار بوده‌اند. پس از مدت فوق به اندازه‌گیری گیرنده LH و پروژسترون تولید شده بوسیله این سلولها مبادرت نمودیم، که این نتایج بدست آمد:

- ۱) رتینول (retinol) در کلیه غلظتها، بر اثر تحریکی FSH برای القای گیرنده LH و تولید پروژسترون اثری نداشت.
- ۲) رتینوئیک اسید (retinoic acid) دارای اثر مهار بر اعمال FSH جهت القای گیرنده LH بوده که این اثر در تولید پروژسترون بیشتر اعمال می‌شد.
- ۳) هپتانول و اکتانول هرکدام به تنهایی توانستند سبب مهار القای گیرنده LH بوسیله FSH شده، اما بر روی سنتز پروژسترون نقش مهاری نداشتند.

مقدمه

اگرچه گنادوتروپینها نقش مهمی در رشد و تکامل فولیکولهای تخمدانی دارند، اما عمل آنها بر روی همه سلولهای گرانولوزا که در یک فولیکول قرار گرفته‌اند، یکسان نمی‌باشد (۱). بعنوان مثال، درحالیکه همه این سلولها دارای گیرنده FSH هستند، ولی گیرنده LH فقط در سلولهایی که در دیواره فولیکول قرار گرفته‌اند القا می‌شود، مشخص شده که این سلولها دارای اتصالات شکافی (gap junction) بیشتری بین خود و سلولهای مجاور هستند که این ارتباطات بین سلولی اجازه

غلظت ۰/۱۰ نانومولار القای گیرنده LH را به میزان تقریبی ۵۰٪ کاهش داده که با غلظتهای بیشتر اثر مهاری بیشتری مشاهده گردید (نمودار ۱)، اما تولید پروژسترون تقریباً به ۲۵٪ سطح کنترل رسید و در مقادیر متفاوت نیز چندان فرقی نکرد. بکاربردن هپتانول یا اکتانول با غلظتهای ۵ و ۱۰ میلی مولار توانست القای گیرنده LH را توسط FSH مهار کند (نمودار ۳)، در حالیکه در غلظتهای کم ۰/۱-۱ میلی مولار هپتانول و اکتانول روی القای گیرنده LH توسط FSH اثری نداشتند. اگرچه تولید پروژسترون بوسیله هپتانول و اکتانول با غلظت ۱۰ میلی مولار مهار شد ولی این عمل با غلظتهای ۰/۱-۵ میلی مولار بوسیله آنها در محیط کشت تحریک گردید (نمودار ۴).

بحث

به منظور تحقیق در مورد نقش ارتباطات شکافی بین سلولهای گرانولوزا در توسعه و تکامل فولیکولها، اثر دو ماده‌ای را که مشخص گردیده می‌توانند این اتصالات را از بین ببرند، یعنی رتینوئیدها و آلکانول مورد مطالعه قرار دادیم. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که القای گیرنده LH و سنتز پروژسترون بوسیله سلولهای گرانولوزای موش رات در محیط کشت به این اتصالات شکافی بین سلولها نیازمند است و اسید رتینوئیک می‌تواند بطور مستقیم بر روی سلولهای گرانولوزا اثر کرده و سبب مهار این اعمال فیزیولوژیک سلولها شود. در بررسیهای قبلی انجام شده، مشخص گردید که بافت تخمدانی رات دارای گیرنده برای رتینوئیدها می‌باشد (۳) که به نظر می‌رسد اعمال این مواد با اثر بر روی این گیرنده‌ها اعمال می‌شود که حتی این اثرات مهاری با غلظتی در حد نانومولار نیز مشاهده شده است.

در این بررسی، رتینول بطور معنی‌دار نتوانست سبب مهار القای گیرنده LH و یا تولید پروژسترون شود، زیرا عمل رتینول از طریق متابولیسم آن به اسید رتینوئیک اعمال می‌شود که بنظر می‌رسد عدم ایفای نقش مهاری رتینول در القای گیرنده LH و تولید پروژسترون، بدلیل ناتوانی سلولهای گرانولوزا در تبدیل رتینول به اسید رتینوئیک به مقدار کافی باشد. نتایج این بررسی

سلولهای زنده باشد، بدست آید. زنده بودن یا زنده نبودن سلولها را با استفاده از تریپین بلو (Trypan-blue) مورد آزمایش قرار دادیم و در نهایت سلولهایی با غلظت ۲ الی ۵ میلیون در هر میلی متر مکعب H-D Media تهیه نمودیم. سلولها را در مجاورت oFSH به مقدار ۱۵ نانوگرم و غلظتهای مختلف رتینوئیک اسید، رتینول، هپتانول و یا اکتانول قرار دادیم. این لوله‌ها در انکوباتور دی‌اکسید کربن (۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ هوا) و در وضعیت صد درصد رطوبت، درجه حرارت دائمی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند. سلولها بمدت ۷۲ ساعت کشت شده و بعد از این مدت گیرنده LH در سلولها و پروژسترون تولید شده در H-D Media اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری گیرنده LH و پروژسترون

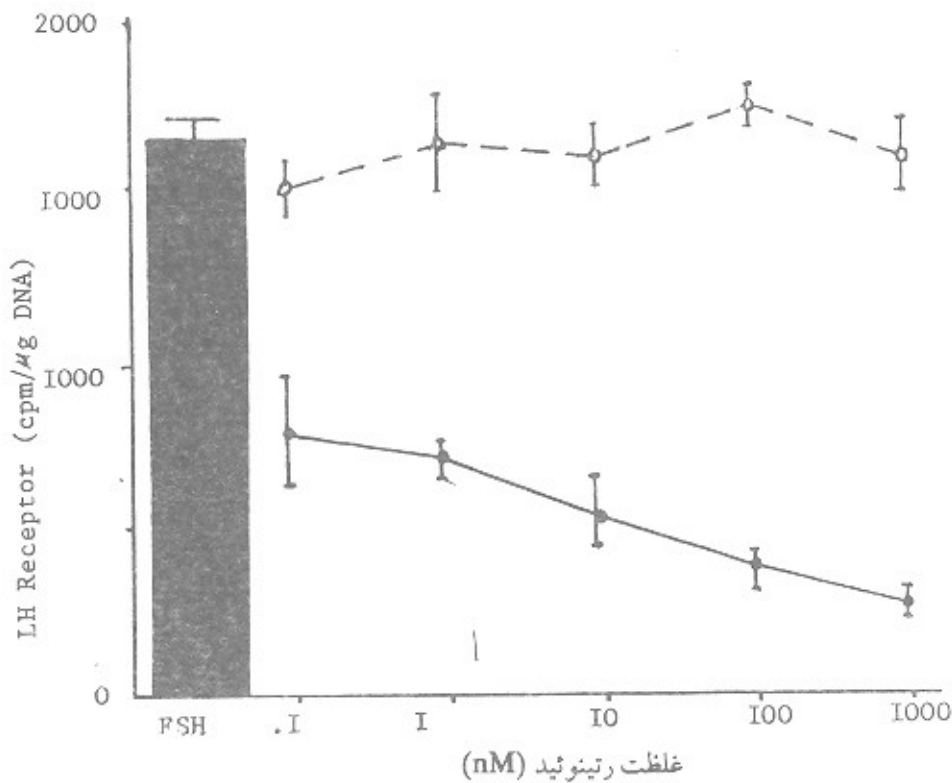
گیرنده‌ها بطور مستقیم با روش Midgley, Sanders (۵) اندازه‌گیری شدند و بر اساس تعداد اتصالات اختصاصی برای hCG برحسب CPM (Count per minutes) به‌ازای هر میکروگرم DNA مشخص گردیدند. محتویات DNA در هر لوله با استفاده از روش فلورومتري Paigen, labarca اندازه‌گیری شدند. مقدار پروژسترون تولید شده در H-D Media با روش radio-immunoassay (RIA) (۶) اندازه‌گیری گردید.

نتیجه

FSH با غلظت ۱۵ نانوگرم توانست گیرنده LH را در سلولهای گرانولوزا القاء نموده و سبب تولید پروژسترون توسط این سلولها شود (نمودارهای ۱ و ۲). در سلولهایی که بدون FSH بعنوان شاهد کشت شده بودند، گیرنده LH القاء نشده و میزان تولید پروژسترون بعلت اندک بودن غیرقابل اندازه‌گیری بود. همچنین رتینوئیدها و آلکانولها به تنهایی قادر به القای گیرنده LH و تولید پروژسترون نبودند. رتینول بر روی اثر تحریکی FSH بر القاء گیرنده LH و تولید پروژسترون بوسیله گرانولوزا اثری نداشت (نمودارهای ۱ و ۲)، اما اسید رتینوئیک با

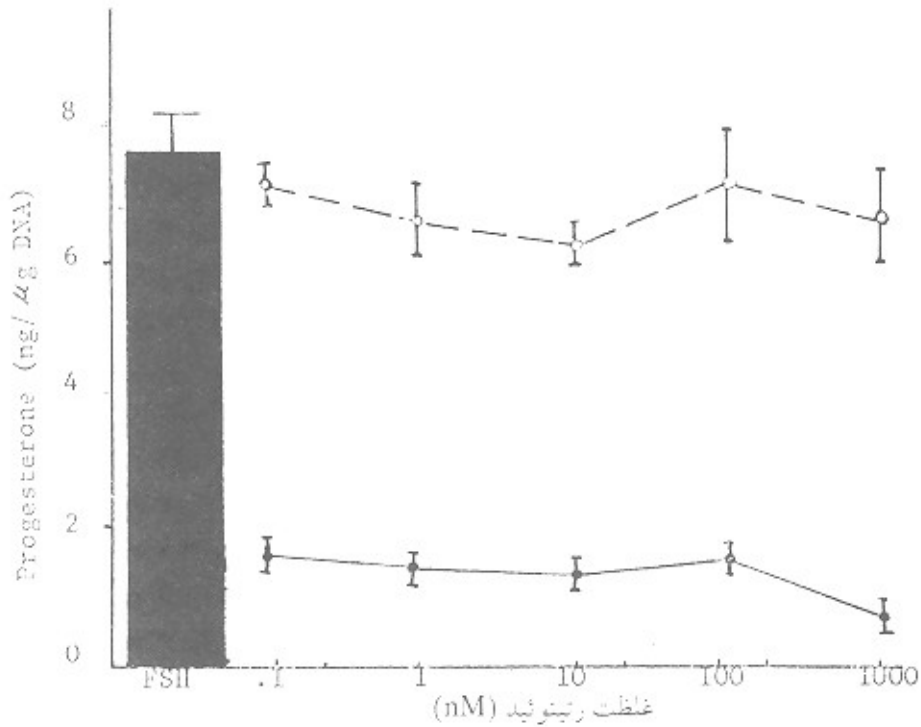
تأثیری در القای گیرنده LH نداشتند، ولی توانستند سنتز پروژسترون را تحریک کنند که بنظر می‌رسد در تحریک ترشح پروژسترون عوامل دیگری نیز نقش داشته باشند.

که بوسیله آکانونها انجام گرفت این نظریه را تأیید می‌کند، زیرا این مواد ارتباطات بین سلولی را بطور مستقیم با اثر بر روی این اتصالات شکافی از بین می‌برند (۷). اگرچه هپتانول و اکتانول با غلظت ۰/۰۱-۰/۱ میلی مولار



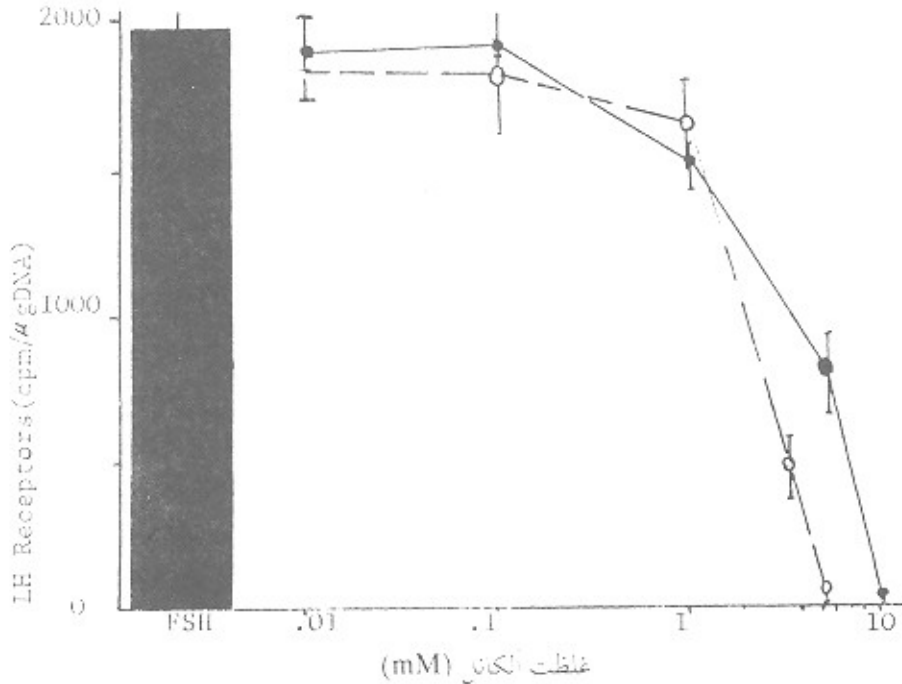
توپر) با غلظتهای مختلف، تعداد گیرنده‌ها برحسب شمارش در هر دقیقه به ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای هر سه نمونه مشابه مشخص شده است.

نمؤدار (۱)- القای گیرنده LH در سلولهای گرانولوزای رات بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به تنهایی (ستون سیاه) یا به همراه رتینول (دایره‌های توخالی)، یا اسید رتینوئیک (دایره‌های



رتسینوتیک (دایره‌های توپر) با غلظت‌های مختلف. مقدار پروژسترون برحسب نانوگرم به‌زای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای سه نمونه مشابه مشخص شده است.

نمودار (۲) - پروژسترون تولیدشده به‌وسیله سلول‌های گرانولوزا در رت بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به‌تنهایی (ستون سیاه) یا به‌همراه رتینول (دایره‌های توخالی) با اسید

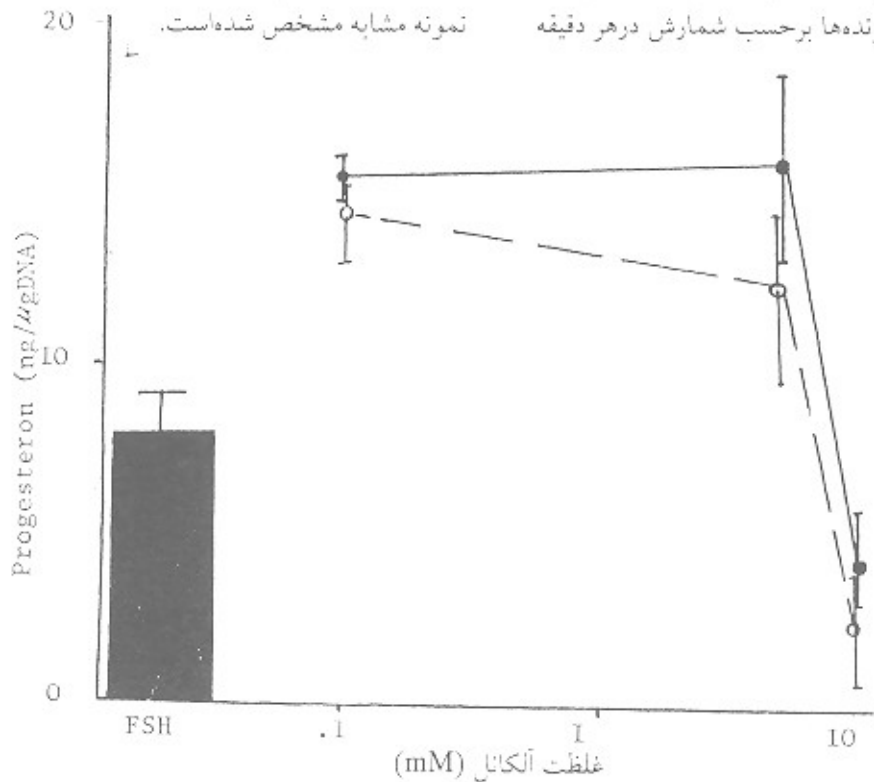


نمودار (۳) - القای گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزا بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به‌تنهایی (ستون سیاه) یا به‌همراه

رتینول (دایره‌های توخالی) در سلول‌های گرانولوزا بعد از

به ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای هر سه نمونه مشابه مشخص شده است.

هیپتانول (دایره های تو خالی) یا اکتانول (دایره های توپر) با غلظت های مختلف، تعداد گیرنده ها بر حسب شمارش در هر دقیقه



دایره های توپر) یا غلظت های مختلف. مقدار پروژسترون بر حسب نانوگرم به ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای سه نمونه مشابه مشخص شده است.

نمودار (۴). پروژسترون تولید شده بوسیله سلول های گرانولوزا بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به تنهایی (ستون سیاه) یا به همراه هیپتانول (دایره های تو خالی) یا اکتانول

REFERENCES

- Zoller, L.C. & Weisz, J. (1979). Identification of cytochrome P-450 and its distribution in the membrane granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinol.* 103, 310-313.
- Zlotkin, T. *et al* (1986). Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage and its use for ultrastructural localisation of the *Endocrinol.* 119, 2809-2820.
- Mehta, P.P, Bertram J & Loewenstein, W.R. (1989). Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cells*, 44, 187-196.
- Walder, L. & Lutzelschwab, R. (1984). Effects of 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), retinoic acid and diazepam on intercellular communication in a monolayer of rat liver epithelial cells. *Expt. Cell Res.* 152, 66-76.
- Sanders, M.M & Midgley, J.R. (1982). Rat granulosa cells differentiation: An in vitro model. *Endocrinol.* 111, 614-624.
- Schulster, A. *et al* (1987). The polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats. Spontaneous changes in characteristic endocrin features. *Biol. Reprod.* 31, 587-69.
- Johnston, M.F, Simon, S.A, & F. (1980). Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature*, 286, 498-500.
- Petdovich, M, Brand, N, Krust, A. & Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330, 444-450.