نقش ارتباطات بین سلولی در القای گیرندهٔ LH در موش رات

دکتر حمیدرضا صادقی‌پور رودسری، استادیار دانشکدهٔ 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 progestrone 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 progestrone 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 قراردارد که مجموعهٔ این عوامل سبب می‌شود که در هر ماه تعدادی از فولیکولها رشد کرده و به غیر از یکی، بقیه ازبین‌بروند ازجمله عوامل مؤثر در این پدیدهٔ تکاملی، احتمالاً ارتباطات شکافی (gap junction) بین سلولهای گرانولوزا

می‌باشد. ما در این آزمایشات اثرات دو ماده‌ای که مشخص گردیده می‌توانند این ارتباطات را ازبین ببرند، یعنی رتینوئیدها و آلکانولها در القای گیرندهٔ LH (receptor) و تولید پروژسترون بوسیلهٔ FSH را مورد مطالعه قراردادیم. موشهای رات نابالغ را بمدت ۷۲ ساعت بصورت کاشتن در زیر جلد تحت اثر دی‌اتیل‌استیل‌بسترول قراردادیم، سپس به تهیه سلولهای گرانولوزا از فولیکولهای تخمدانی آنها که در مرحلهٔ preantral follicle قرارداشتند اقدام نموده و سلولها را بمدت سه روز در انکوباتور (incubator) تحت اثر ۱۵ نانوگرم FSH قراردادیم که در این زمان سلولها در مجاورت رتینوئیک اسید، رتینول با غلظتهای ۰/۱ ـ ۱۰۰۰ نانومولار و هپتانول یا اکتانول با غلظتهای ۰/۰۱ ـ ۱۰ میلی مولار بوده‌اند. پس از مدت فوق به اندازه‌گیری گیرندهٔ LH و پروژسترون تولید شده بوسیلهٔ این سلولها مبادرت نمودیم، که این نتایج بدست آمد:

۱) رتینول (retinol) در کلیهٔ غلظتها، براثر تحریکی FSH برای القای گیرندهٔ LH و تولید پروژسترون اثری نداشت.

۲) رتینوئیک اسید (retinoic acid) دارای اثر مهاری بر اعمال FSH جهت القای گیرندهٔ LH بوده که این اثر در تولید پروژسترون بیشتر اعمال می‌شد.

۳) هپتانول و اکتانول هرکدام به تنهایی توانستند سبب مهار القای گیرندهٔ LH بوسیلهٔ FSH شده، اما برروی سنتز پروژسترون نقش مهاری نداشتند.

مقدمه

اگرچه گنادوتروپینها نقش مهمی در رشد و تکامل فولیکولهای تخمدانی دارند، اما عمل آنها برروی همهٔ سلولهای گرانولوزاکه در یک فولیکول قرارگرفته‌اند، یکسان نمی‌باشد (۱). بعنوان مثال، درحالیکه همهٔ این سلولها دارای گیرندهٔ FSH هستند، ولی گیرندهٔ LH فقط در سلولهایی که در دیوارهٔ فولیکول قرارگرفته‌اند القا می‌شود، مشخص‌شده که این سلولها دارای اتصالات شکافی (gap junction) بیشتری بین خود و سلولهای مجاور هستند که این ارتباطات بین سلولی اجازه می‌دهد که مولکولهای کوچک ازجمله 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) برروی القای گیرندهٔ LH و تولید پروژسترون، مورد مطالعه قراردادیم. بدیهی است توانایی یک الکل برای ازبین بردن اتصالات شکافی بستگی به طول زنجیر آلکیل‌کنندهٔ آن داشته که در این میان هپتانول (Heptanol) و اکتانول (Octanol) از قدرت بیشتری برخوردار هستند.

مواد و روشها

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

طرز تهیهٔ سلولهای گرانولوزا

پس از کشتن موشها با گیوتین، بلافاصله هر دو تخمدان جدا و سپس چربیهای اطراف آنها را جدا کرده و در داخل ظروف‌کشت سلولی که محتوی HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) بودند گذاشتیم. آنگاه با سر سوزن استریل نمرهٔ ۲۶ سوراخهای زیادی در روی تخمدانها ایجادنمودیم، تا به‌این 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 قراردادیم تا سلولهای مرده خارج شده و محصولی که حدود ۸۵ـ۸۰٪

سلولهای زنده باشد، بدست آید. زنده‌بودن یا زنده‌نبودن سلولها را با استفاده از تریپن‌بلو (Trypan-blue) مورد آزمایش قراردادیم و در نهایت سلولهایی با غلظت ۲ الی ۵ میلیون در هر میلی‌متر مکعب H-D Media ،تهیه نمودیم. سلولها را در مجاورت oFSH به‌مقدار ۱۵ نانوگرم و غلظتهای مختلف رتینوئیک اسید، رتینول، هپتانول و یا اکتانول قراردادیم. این لوله‌ها در انکوباتور دی‌اکسیدکربن (۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۵٪ هوا) و در وضعیت صددرصد رطوبت، درجهٔ حرارت دائمی ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرارداشتند. سلولها بمدت ۷۲ ساعت کشت شده و بعد از این مدت گیرندهٔ LH در سلولها و پروژسترون تولیدشده در H-D Media اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری گیرندهٔ LH و پروژسترون

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

نتیجه

FSH با غلظت ۱۵ نانوگرم توانست گیرندهٔ 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 شده‌بودند، گیرندهٔ LH القا نشده و میزان تولید پروژسترون بعلت اندک‌بودن غیرقابل اندازه‌گیری بود. همچنین رتینوئیدها و آلکانولها به تنهایی قادر به القای گیرندهٔ LH و تولید پروژسترون نبودند. رتینول برروی اثر تحریکی FSH برالقاء گیرندهٔ LH و تولید پروژسترون بوسیلهٔ گرانولوزا اثری نداشت (نمودارهای ۱ و ۲)، اما اسید رتینوئیک با غلظت ۰/۱۰ نانومولار القای گیرندهٔ LH را به میزان تقریبی ۵۰٪ کاهش‌داده 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 میلی‌مولار توانست القای گیرندهٔ LH را توسط FSH مهار کند (نمودار ۳)، در حالیکه در غلظتهای کم ۱-۰/۱ میلی‌مولار هپتانول و اکتانول روی القای گیرندهٔ LH توسط FSH اثری نداشتند. اگرچه تولید پروژسترون بوسیلهٔ هپتانول و اکتانول با غلظت ۱۰ میلی‌مولار مهارشد ولی این عمل با غلظتهای ۵-۰/۱ میلی‌مولار بوسیلهٔ آنها در محیط کشت تحریک گردید (نمودار ۴).

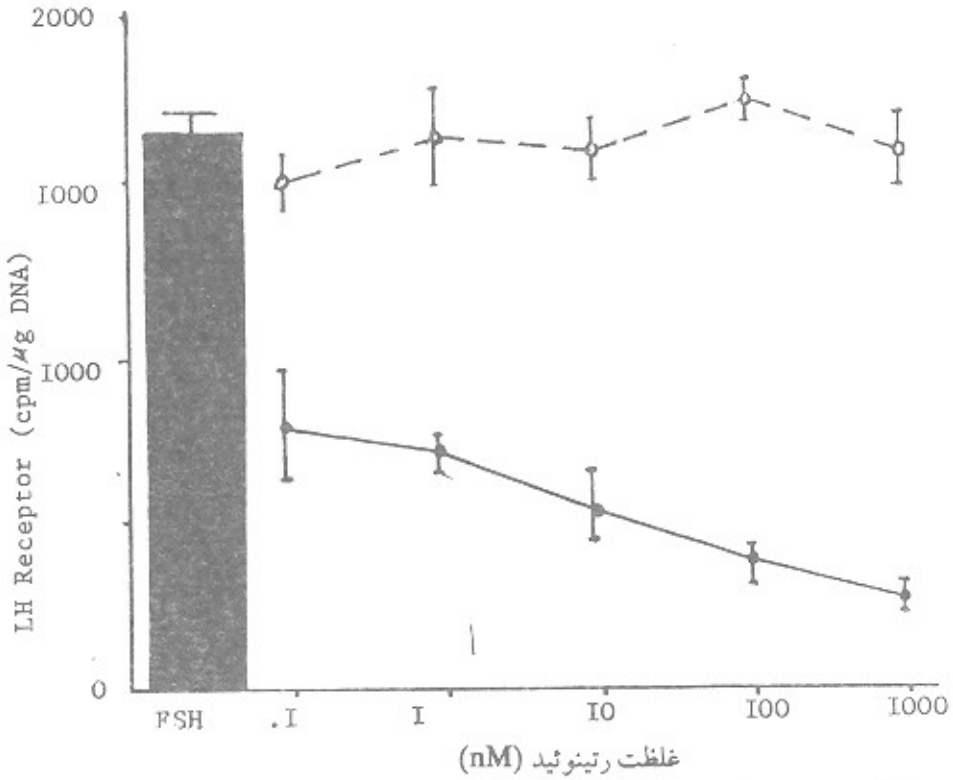
بحث

به‌منظور تحقیق درمورد نقش ارتباطات شکافی بین سلولهای گرانولوزا در توسعه و تکامل فولیکولها، اثر دو ماده‌ای را که مشخص گردیده می‌توانند این اتصالات را ازبین ببرند، یعنی رتینوئیدها و آلکانول مورد مطالعه قراردادیم. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که القای گیرندهٔ LH و سنتز پروژسترون بوسیلهٔ 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 انجام‌شده، مشخص گردید که بافت تخمدانی رات دارای گیرنده برای رتینوئیدها می‌باشد (۳) که به‌نظر می‌رسد اعمال این مواد با اثر بر روی این گیرنده‌ها اعمال می‌شود که حتی این اثرات مهاری با غلظتی در حد نانومولار نیز مشاهده شده‌است.

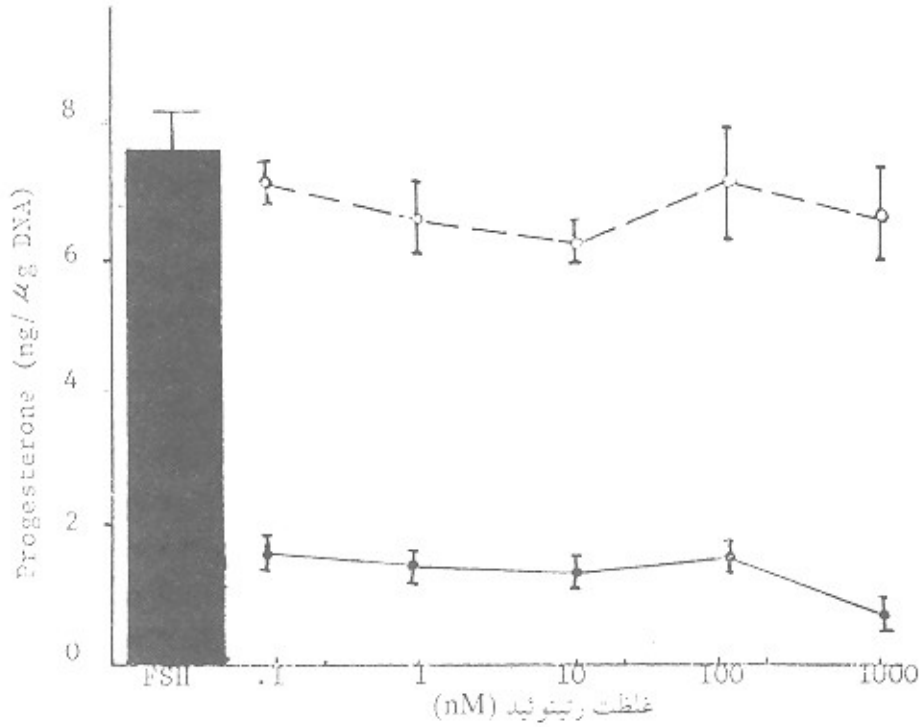
در این بررسی، رتینول بطور معنی‌دار نتوانست سبب مهار القای گیرندهٔ LH و یا تولید پروژسترون شود، زیرا عمل رتینول ازطریق متابولیسم آن به اسید رتینوئیک اعمال می‌شود که بنظر می‌رسد عدم ایفای نقش مهاری رتینول در القای گیرندهٔ LH و تولید پروژسترون، بدلیل ناتوانی سلولهای گرانولوزا در تبدیل رتینول به اسید رتینوئیک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

که بوسیلهٔ آلکانولها انجام گرفت این نظریه را تأئید می‌کند، زیرا این مواد ارتباطات بین سلولی را بطور مستقیم با اثر برروی این اتصالات شکافی ازبین می‌برند (۷).

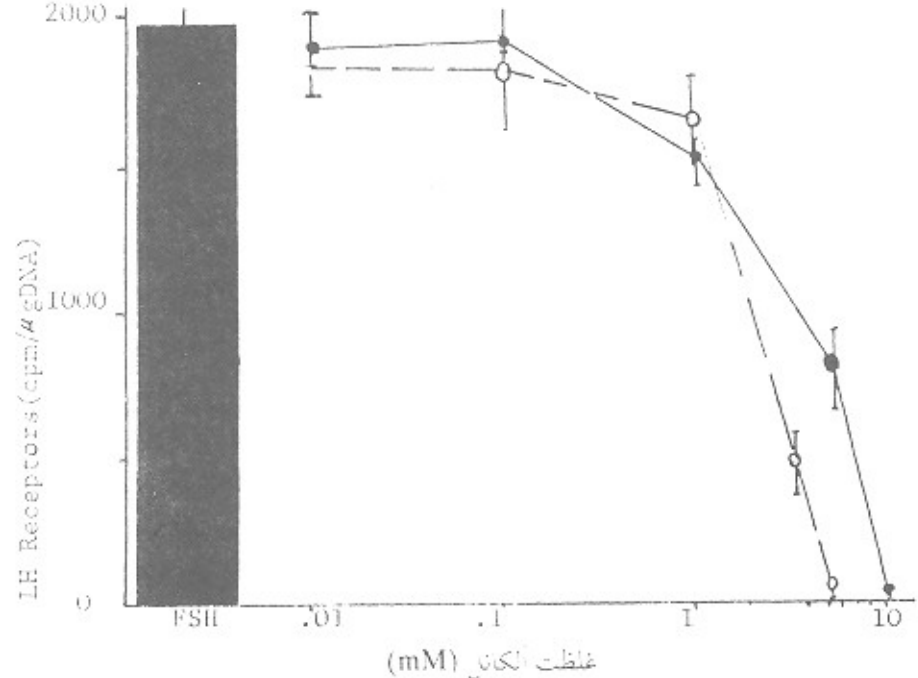
اگرچه هپتانول و اکتانول با غلظت ۰/۱-۰/۰۱ میلی‌مولار تأثیری در القای گیرندهٔ LH نداشتند، ولی توانستند سنتز پروژسترون را تحریک کنند که بنظر می‌رسد در تحریک ترشح پروژسترون عوامل دیگری نیز نقش داشته‌باشند.



نمودار (۱)- القای گیرندهٔ 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 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 شده‌است.

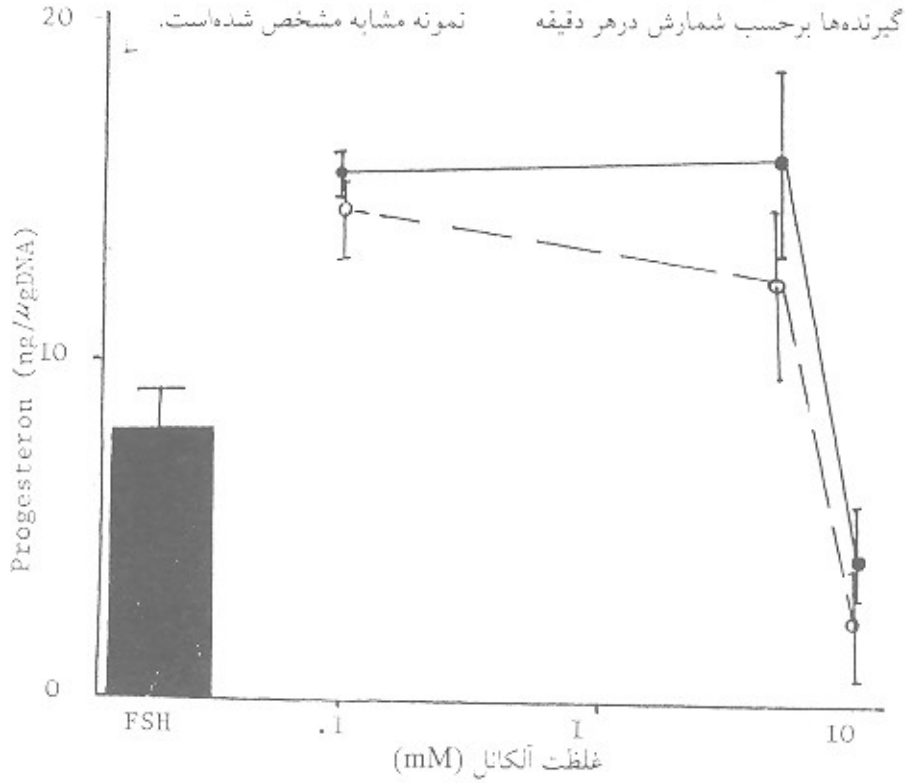


نمودار (۲)- پروژسترون تولیدشده بوسیلهٔ سلولهای گرانولوزا در رت بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به‌تنهایی (ستون سیاه) یا به‌همراه رتینول (دایره‌های توخالی) یا اسید رتینوئیک (دایره‌های توپر) با غلظتهای مختلف. مقدار پروژسترون برحسب نانوگرم به‌ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای سه نمونه مشابه مشخص شده است.



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

هپتانول (دایره‌های توخالی) یا اکتانول (دایره‌های توپر) با غلظتهای مختلف. تعداد گیرنده‌ها برحسب شمارش درهر دقیقه به‌ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای هرسه نمونه مشابه مشخص شده‌است.



نمودار (۴)- پروژسترون تولیدشده بوسیلهٔ سلولهای گرانولوزا بعد از ۷۲ ساعت مجاورت با FSH به تنهایی (ستون سیاه) یا به‌همراه هپتانول (دایره‌های توخالی) یا اکتانول (دایره های توپر) با غلظتهای مختلف. مقدار پروژسترون برحسب نانوگرم به‌ازای هر میکروگرم DNA و متوسط خطای معیار برای سه نمونه مشابه مشخص شده‌است.

REFERENCES

1) 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.

2) Zlotkin, T. *et al* (1986). Cell-specific expression of immunoreactive cholestrol side-chain cleavage and its use for ultrastuctural localisation of the *Endocrinol., 119,* 2809-2820.

3) Mehta, PP, Bertram J & Loewenstein, WR. (1989). Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cells, 44,* 187-196.

4) 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.

5) Sanders, MM & Midgley, JR. (1982). Rat granulosa cells differentiation: An in vitro model. *Endocrinol. 111,* 614-624.

6) Schulster, A, *et al* (1987). The polycystic ovarian condition in estradiole valerate-treated rats: Spontaneous changes in characteristic endocrin features. *Biol. Reprod., 31,* 587-69.

7) Johnston, Mf, Simon, SA, & F. (1980). Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature, 286,* 498-500.

8) Petdovich, M. Brand, N, Krust, A, & Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor whitch belongs to the family of nuclear receptors. *Nature, 330,* 444-450.