

نقش هیالورونان در طی تکامل فولیکول تخمدانی موش

دکترسید محمد حسینی پناه^{۱*}، دکتر محمد آهی^۲، دکتر مهران حبیبی رضانی^۳، دکتر مصطفی حسینی^۴،ولی ا.. مرادی^۵، علی اکبر رجب زاده^۵

تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۱۵

چکیده

مقدمه: هیالورونان، گلیکوز آمینوگلیکان بسیار طولی است که با سایر گلیکوز آمینوگلیکان ها متفاوت بوده و در ماده خارج سلولی آزاد میشود. این ملکول ها در شکل گیری ماتریکس، چسبندگی سلول به سلول و سلول به ماتریکس، تکثیر و مهاجرت سلولی نقش دارند و تغییرات مشخصی را در طول تکامل فولیکول تخمدانی ایجاد می کنند. هدف از این تحقیق تغییرات اسید هیالورونیک در قسمت های مختلف فولیکول در طول چرخه تخمدانی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد شصت سر موش با نژاد N-MARI و با وزن ۲۵-۳۰ گرم از موسسه رازی کرج خریداری شد. پس از عادت به شرایط آزمایشگاه و رسیدن به سن بلوغ (هشت تا ده هفتگی) مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از تغییر نمای سیستم تناسلی خارجی که دال بر شروع چرخه تخمدانی بود، تخمدان آنها خارج گردید و تغییر حضور هیالورونان با استفاده از روش هیستوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: با استفاده از رنگ آمیزی با آلسین بلو، $pH=3/2$ ، هیالورونان در قطعات بافتی تهیه شده از تخمدان ارزیابی شد. براساس مشاهدات بعمل آمده بیان هیالورونان در طول تکوین فولیکول ها تا مرحله قبل از تخمک گذاری افزایش می یابد. ساخت هیالورونان در منطقه شفاف، غشاء پایه و سلولهای تک داخلی فولیکول روندی افزایشی را تا انتها طی میکند، اما در سلول ها و مایع فولیکولی بعد از مرحله آنترال کاهش نشان می دهد.

نتیجه گیری نهایی: بنابر این نتیجه می گیریم که بیان هیالورونان برای گسترش مجموعه سلولی کومولوس اووفروس، بیرون پریدن این مجموعه به هنگام تخمک گذاری و افزایش سرعت حرکت اسپرم جهت عمل لقاح مورد نیاز می باشد.

واژه های کلیدی: هیالورونان، تکامل، فولیکول، تخمدان، موش.

Email: hosseinipناه@hotmail.com

۱- استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

۴- استادیار گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- مربی گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه

تشکیل گامت ها در روند تکاملي نیاز به تغییراتي در سطح سلول ها دارند. برای مثال سلول در بیان ملکول هاي مسئول چسبندگی خود، تغییراتي ایجاد مي کند. این مولکولها شامل مولکول هاي چسبندگی سلول به سلول، سلول به ماتریکس و مولکولهاي موجود در ماتریکس خارج سلولي هستند. تغییر در چسبندگی سلول ها مي تواند تغییر شکل سلول را به همراه داشته و یا حرکت و عمل سلول را تغییر دهد (۱). بسیاری از مولکولهاي سطح سلول و ماتریکس خارج سلولي که در چسبندگی سلول به سلول و سلول به ماتریکس نقش دارند، در واقع ترکیبات قندي مي باشند (۲). این مولکول ها شبکه هاي فیبریلار از پروتئو-گلیکان ها و گلیکوپروتئین ها را در ماتریکس خارج سلولي مي سازند و شامل مولکول هاي متصل به سطح سلول و مولکول هاي مسئول چسبندگی سلول مي باشند. از طرفي این مولکول ها از مواد عمده ماتریکس خارج سلولي بشمار مي روند و هر کدام يك یا چند گیرنده اختصاصي در روي غشاء سلول داشته که به آنها متصل مي شوند (۳). از طریق این گیرنده ها اطلاعاتي که تغییرات ساختماني را تنظیم مي کند، بداخل سلول منتقل شده و بسیاری از پدیده هاي زیستی از قبیل چسبندگی، رشد، مرگ برنامه دار سلولي و تمایز را متأثر مي نماید (۴).

اهمیت بخش کربوهیدراتي این ترکیبات و همین طور قند انتهائي آنها در پدیده هاي بیولوژیک و در مسیر تکامل توسط بسیاری از محققین عنوان شده است (۵).

هیالورونان به میزان زیادی در ماتریکس خارج سلولي کومولوس اووفروس وجود دارد که در تسهیل عمل لقاح نقش داشته و تعدادي از اعمال آکروزوم را بعد از اتصال اسپرم به زونا پلوسیدا افزایش مي دهد (۶) و در تکامل اووسیت هاي بالغ و لقاح یافته در مرحله بلاستوسیست نقش دارد (۷). هیالورونان در نفوذ پذیری اسپرم و عمل متقابل گامت ها نقش داشته و در تحرک اسپرم مؤثر است. از آنجائی که تحرک اسپرم يك فاکتور مهم در عمل لقاح مي باشد لذا

هیالورونان مي تواند بعنوان يك عامل افزایش دهنده تحرک اسپرم در لقاح مطرح گردد (۸).

با كمك تكنيك هاي هیستوشیمیائي خاص میتوان ترکیبات قندي را با رنگ هاي قابل رؤیت نشاندار کرد. برخی از این تکنیک ها نظیر محلول آلسین بلو در pH هاي مختلف مي تواند ترکیبات قندي با بار منفي را که با ترکیبات ماتریکس خارج سلولي و یا سطح سلول ارتباط دارند، مورد شناسایی قرار دهد (۹).

چرخه تخمداني با شروع رشد در چند فولیکول آغاز شده و جریان مداومي از تکامل فولیکول ها را شکل مي دهد که در این روند از مراحل مختلف تکاملي عبور نموده تا تخمک گذاري انجام شود (۱۰). در این روند ساخت و ترشح گلیکوپروتئین ها توسط اووسیت و سلول هاي فولیکولي از اهمیت بالايي برخوردار است. با توجه به روندی که سلول هاي مختلف بافت تخمداني در طی چرخه فولیکولي دارند و همراه با بیان گلیکوپروتئین ها در سطح سلولي است لذا نقش گلیکوزامینوگلیکان اسید هیالورونیک یا هیالورونان را در طی تکامل فولیکول ها در تخمدان موش مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش ها

تعداد شصت راس موش باکره (virgin) از نژاد N-MARI که در سن پنج هفتگی قرار داشتند از مؤسسه رازی کرج خریداري شد. سپس جهت عادت به محیط و همچنین رسیدن به سن بلوغ (هشت تا ده هفته) در شرایط استاندارد نگهداري شدند. با مشاهده ناحیه واژینال و وجود علائمی از سیکل تخمداني انتخاب و سپس با قطع نخاع که منجر به مرگ حیوان مي شد، به دقت تشریح گردیده و بلافاصله تخمدان ها خارج شد و در محلول فرمالین ۱۰٪ تازه تهیه شده قرار گرفتند.

نمونه هاي فوق به روش معمول بافت شناسي پاساژ داده و سپس بلوکهاي تهیه شده بكمك میکروتوم با ضخامت 3µm بریده شدند (۹). سپس روش های رنگ آمیزی هیستوشیمی آلسین بلو با pH=۳/۲ انجام شد.

زیر درجه بندی گردید. طریقه درجه بندی شدت رنگ ها در این مطالعه طبق جدول زیر و بر اساس کار Gony و همکارانش انجام شد (۱۱).

پس از بررسی لام های رنگ شده، هر بخش اختصاصی از بافت تخمدانی براساس شدت واکنش به رنگ ها از صفر تا چهار بر طبق جدول

راهنمای درجه بندی شدت رنگ آمیزی

رتبه ها	توضیح
۰	هیچ رنگی مشاهده نشد
۱	شدت رنگ آمیزی : بسیار کم
۲	شدت رنگ آمیزی : کم
۳	شدت رنگ آمیزی : متوسط
۴	شدت رنگ آمیزی : زیاد

فولیکول اولیه:

واکنش با شدت متوسطی در مایع فولیکولی، منطقه شفاف و غشاء پایه دیده شد ولی در سایر قسمت ها واکنش با شدت بسیار کم وجود داشت (شکل ۱-B).

فولیکول آنترال و بعد از تشکیل آنتروم(Postantral):

واکنش با شدت کم در قسمت های مختلف فولیکول وجود داشت که در مایع فولیکولار با شدت متوسط و در منطقه شفاف و غشاء پایه با شدت زیاد دیده شد (اشکال ۱-C، ۱-D، ۱-E).

فولیکول قبل از تخمک گذاری:

واکنش با شدت کم در مایع فولیکولار و سیتوپلاسم اووسیت و با شدت متوسط در سلول های فولیکولی و تکا و با شدت زیاد در منطقه شفاف و غشاء پایه همراه بود (شکل ۱-F).

جداول مربوط به هر رنگ آمیزی تهیه گردید و پس از کدگذاری اطلاعات فوق توسط کامپیوتر و به روش آنالیز واریانس یک طرفه ی غیرپارامتری کروسکال- والیس (Kruskal- Wallis) و توسط برنامه SPSS آنالیز شد.

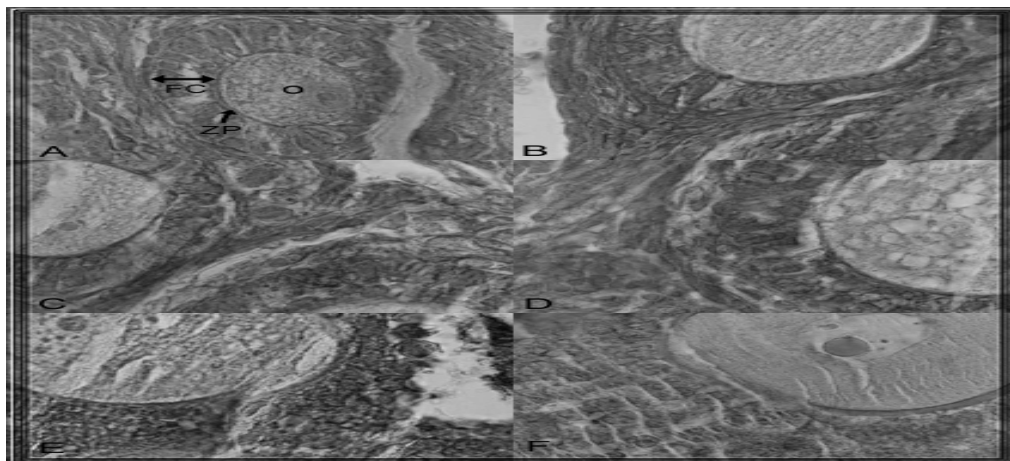
یافته های پژوهش

فولیکول بدوی:

واکنش اجزاء مختلف این فولیکول نسبت به محلول آلسین بلو با $pH=3/2$ منفی بود.

فولیکول بینابینی:

واکنش با شدت بسیار کمی نسبت به محلول آلسین بلو با $pH=3/2$ دیده شد بجز آن که نسبت به منطقه شفاف با شدت متوسط و نسبت به غشاء پایه با شدت کم مشاهده گردید (شکل ۱-A).



شکل ۱: واکنش مراحل مختلف تکامل فولیکول با استفاده از محلول آلسین بلو با $pH=3/2$ نشان داده شده است (بزرگنمایی مقاطع ۱۰۰۰) (A) فولیکول بینابینی، (B) فولیکول اولیه، (C) فولیکول Preovulatory، (D) فولیکول Antral، (E) فولیکول Postantral، (F) فولیکول Preovulatory. O= Oocyte, ZP= Zona Pellucida, FC= Follicular Cells

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق بیان اسید هیالورونیک در مرحله فولیکول بینابینی در منطقه شفاف صورت می گیرد و سپس به شدت آن افزوده گشته تا اینکه در مرحله فولیکول آنترال و بعد از تشکیل آنتروم به حداکثر میزان خود می رسد و سپس در مرحله قبل از تخمک گذاری از شدت آن کاسته می شود. تشکیل این منطقه حاصل مشارکت سلول های اووسیت و فولیکولار می باشد. بنابراین ساخت اسید هیالورونیک نیز توسط این سلول ها صورت می گیرد. از طرف دیگر حضور هیالورونان در مایع فولیکولی از مرحله فولیکول اولیه شروع و سپس بر میزان شدت آن افزوده گشته تا همچنین در مرحله قبل از تخمک گذاری از شدت آن کاسته می شود. بنابراین سلول های فولیکولار این گلیکوزآمینوگلیکان را هم در بین خود یعنی مایع فولیکولار ترشح نموده تا در هنگام تخمک گذاری کمک به جدا شدن مجموعه سلولی کومولوس اووفروس و سپس رها شدن از فولیکول گردد.

این موضوع توسط Tirone و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۱۲) چنین بیان شده است که اسید

هیالورونیک توسط سلول های کومولوس ۲-۳ ساعت بعد از آنکه تحت تاثیر تحریک گونادوتروپین ها قرار گرفت ساخته شده و مقدار آن ۴ تا ۱۰ ساعت بعد به حداکثر میرسد. سپس شروع به کاهش نموده که این پدیده ۱۸ ساعت بعد رخ می دهد. بنابراین با توجه به نتایج کسب شده که حاکی از افزایش تدریجی اسید هیالورونیک در تکامل فولیکول میباشد بیانگر این مطلب است که بلوغ مجموعه سلول کومولوس و اووسیت پستانداران در مرحله قبل از تخمک گذاری سبب درگیری ترکیب ماتریکس خارج سلولی غنی از هیالورونان را به وسیله سلول های کومولوس دارد که حداقل دو ژن کدکننده این پروتئین ها وجود داشته که در انسان و موش مشابه می باشند (۱۳).

اطلاعات موجود حاکی از وجود این فرضیه است که FSH داخل فولیکول نقش مهمی در ترشح اسید هیالورونیک بوسیله سلول های گرانولوزا دارد (۱۴) که بتدریج با تکثیر سلولهای فولیکولی بر میزان آنها افزوده گردیده و سپس با نزدیک شدن به مراحل آخر تکامل فولیکول گیرنده های FSH بر سلول های فولیکولی نقش خود را کم رنگ تر می نمایند. سلول هایی که مجاور مایع فولیکولار هستند در ترشح اسید هیالورونیک موجود در مایع

هیالورونان می تواند نقش اختصاصی در بلوغ میزان تحرک و فرآیند باروری داشته باشد (۲۰). مطالعات ذکر شده فوق به همراه مطالعه حاضر مؤید این مطلب است که هیالورونان تأثیر بسزایی بر روی افزایش تحرک اسپرم دارد. مکانیسم اثر آن روی فاکتور فوق به این صورت است که در سطح سلول دو گیرنده هیالورونان بنام های CD44 و Receptor for Hyaluronan Mediated Motility (RHAMM) وجود دارد (۲۱). هیالورونان با عمل متقابل خود با این گیرنده ها و افزایش فسفوریلاسیون پروتئین های اتصال هیالورونان ابتدا در دم اسپرم اتفاق می افتد و در نهایت باعث افزایش کلسیم داخل سلولی می گردد. هیالورونان عمل افزایش کلسیم داخل سلولی را در اسپرم بواسطه تأثیر متقابل با گیرنده غشاء پلاسمایی pH-20 انجام می دهد. بدین طریق که هیالورونان متصل به گیرنده pH-20 باعث تجمع گیرنده های زیادی در سطح نشان می دهد که باعث افزایش عمل آکروزم بعد از اتصال به زونا پلوسیدا می شوند (۲۲). مهمترین عملی که برای گیرنده جدید هیالورونان یعنی RHAMM موجود در سطح اسپرم بیان می شود افزایش تحرک اسپرم توسط این گیرنده در پاسخ به هیالورونان می باشد (۲۳).

تقدیر و تشکر

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان مباشر کاشانی دانشگاه علوم پزشکی همدان خاصاً استاد گرامی جناب آقای دکتر محمود ستاری و آقای مهندس سید محمد امیر حسینی پناه اجرا شده است که بدین وسیله مراتب قدر دانی و تشکر خود را از نامبردگان ابراز میداریم.

فولیکولی، نسبت به سلول هایی که جدای از این مایع در لایه خارجی قرار گرفته اند، از نقش بالایی برخوردار هستند (۱۵). مسلماً فاکتورهای محلولی جهت رشد نهایی اووسیت ها اساسی است این فاکتورها همراه با هورمون FSH جهت تحریک ساخت اسید هیالورونیک توسط سلول های کومولوس مورد نیاز است (۱۶). pH مورد نیاز جهت ثبوت اتصال ماتریکس خارج سلولی سلولهای کومولوس $pH=7.0$ می باشد که این اتصال بدون واسطه بین ماتریکس خارج سلولی سلول های کومولوس و اسید هیالورونیک رخ می دهد (۱۷).

از طرفی با مطالعه ای که Vines و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام دادند مشخص شد که یک ناحیه پپتیدی بنام pH-20 در اتصال هیالورونان به سلول نقش دارد. این امر با پدیده Signaling (علامت دادن) سلول که در طی نفوذ اسپرم به کومولوس با افزایش کلسیم داخل اسپرم ایجاد می شود، ارتباط دارد (۱۸). مهم ترین اثر هیالورونیک اسید روی اسپرم افزایش سرعت و حرکت آنست که حتی پس از گذشت سه ساعت همچنان بالا باقی میماند (۱۹). مکانیسم افزایش تحرک اسپرم به این ترتیب است که هیالورونان بطور غیر مستقیم از طریق افزایش فسفوریلاسیون پروتئین هایی که حاوی گیرنده های متصل شونده به هیالورونان هستند باعث افزایش تحرک اسپرم می شود. وجود یک گلیکوپروتئین سلولی متصل به هیالورونان بنام HABP با وزن ملکولی حدود 68 کیلو دالتون در اسپرم گونه های مختلف (موش، گاو و انسان) به وسیله آنالیز ایمونوبلاست و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از آنتی بادی های پلی کلونال نشان داده شد. این گلیکوپروتئین بر روی سر قطعه میانی و دم اسپرم در گونه های مختلف توزیع متفاوتی دارد. همه این اطلاعات بوضوح نشان می دهند که پروتئین متصل به

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 heart; Focus-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 oocytes 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 (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β 1). *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 environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding. *Eur J Obstet 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 vitreous 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

Role of Hyaluronan During Folliculogenesis of Mouse

Hosseiniapanah M^{1*}, Ahi M², Habibirezaii M³, Hosseini M⁴, Moradi V⁵,
Rajabzade A⁵.

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. Their synthesis changes significantly during ovarian follicular development. This study was aimed to recognize 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