بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت معلم
دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته سلولی-تکوینی جانوری

بررسی اثر زهر زنبور عسل بر بیان سیکلواکسیژناز دو در سندرم تخمدان پلی کیستیک القا شده در موش رت نژاد ویستار

استاد راهنما:
دکتر محمد نبیونی

استاد مشاور:
دکتر کاظم پریور
دکتر بهمن زینلی

تهیه و تنظیم:
لطیفه کریم زاده باردیی

تیرماه 1390

چکیده

سندرم تخمدان پلی کیستیک(PCOS) اختلال سیستم تولیدمثلی و نارسایی اندوکرینی است که با رشد سریع اولیه ی فولیکولی و عدم انتخاب یک فولیکول غالب از ذخیره ی افزایش یافته ی فولیکولی، هایپراندروژنیسم، افزایش آنژیوژنز، جریان خون تخمدانی و متعاقبا عدم تخمک گذاری مزمن همراه است. این سندرم همچنین به عنوان یک بیماری التهابی با افزایش سطح سیتوکین ها و نیز افزایش CRP سرم معرفی شده است. نظر به اثرات آنژیوژنیک سیکلواکسیژناز2 (COX-2) و نیز با توجه به اثرات مهاری زهر زنبور عسل(HBV) بر آنژیوژنز پاتولوژیک و بیماری های التهابی مانند آرتریت روماتویید، در این تحقیق تلاش گردید اثرات زهر زنبور عسل بر بیان COX-2 در لایه های مختلف فولیکول های تخمدانی بررسی گردد. بدین منظور تعدادی رت بالغ نژاد ویستار(Wistar) که از نظر سیکل استروس دارای سه دوره سیکل منظم استروس بودند انتخاب شده و به دو گروه کنترل(Cont) و گروه مبتلا به PCOS القا شده با استرادیول ولرات(EV) تقسیم گردیدند. به گروه EV دو میلی گرم استرادیول ولرات(شرکت داروسازی ابوریحان) بصورت زیر پوستی وتک مرحله ای تزریق شد. پس ازگذشت 60 روز و اطمینان از القای سندرم در رت ها با استفاده از بررسی های هیستولوژیک، رت ها به عنوان گروه پلی کیستیک تیمار شده با زهر زنبور عسل(HBV) به مدت 10 روز متوالی تحت تزریق یک میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، به صورت درون صفاقی قرار گرفتند(EV+ HBV). گروه شم از گروهEV، حلال استرادیول یعنی روغن کنجد و گروه شم از گروه EV+HBV به همان میزان حلال HBV یعنی سالین دریافت کردند. پس از 10 روز موش ها را کشته و تخمدان ها به منظور مقایسه ی مورفولوژیکی و بافتی و بررسی ایمونولوژیک COX-2 برداشت گردیدند. گروه های شم در اولین سری آزمون به دلیل عدم تفاوت با گروه کنترل حذف گردید. داده های بدست آمده با تست پارامتریک one-way ANOVA آنالیز شدند. نتایج نشان داد که ضخامت لایه ی گرانولوزا و غلاف فولیکولی، شمار و اندازه ی کیست ها در گروه EV+HBV کاهش معنا داری نسبت به گروه EV نشان داد. حضور جسم زرد در گروهEV+HBV و نیز کاهش میزان سرمی CRP در این گروه نشان از اثرات

درمانی HBV بر این سندرم داشت. علاوه بر مشاهدات هیستولوژیک و بررسی های هورمون های جنسی در سرم خون، این نتایج با کاهش بیان COX-2 در مکان های اختصاصی بیان COX-2 در تخمدان همخوانی داشت. زهر زنبور عسل دارای اثرات مهاری بر بیان COX-2 در تخمدان بوده و با کاهش بیان COX-2 سبب کاهش لایه های گرانولوزا و غلاف فولیکولی، کاهش علایم التهاب و تعدیل هورمون های جنسی می شود و با اعمال تخمک گذاری و تولید جسم زرد سبب بهبود موروفولوژیک، هیستولوژیک و متابولیک تخمدان های پلی کیستیک همراه با التهاب و سوق آن به سمت تخمدان های سالم و فعال می گردد.

کلمات کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، استرادیول ولرات، زهر زنبور عسل، سیکلواکسیژناز، C-reactive protein (CRP).

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه و کلیات ۷

۱-۱ دستگاه تولید مثلی ماده در پستانداران ۸

۱-۱-۱ بافت شناسی دستگاه تولید مثلی ماده در پستانداران ۸

۱-۱-۲ تکوین دستگاه تولید مثلی ماده پستانداران ۸

۱-۱-۳ فولیکول زایی ۹

۱-۱-۴ زمان شناسی فولیکول زایی: ۱۲

۱-۱-۵ تخمک گذاری: ۱۳

۱-۱-۶ تشکیل جسم زرد ۱۳

۱-۱-۲ محور هورمونی هیپوتالاموس_ هیپوفیز_ تخمدان ۱۵

۱-۱-۲-۱ هورمون آزادکننده ی گنادوتروپین ها ۱۵

۱-۱-۲-۲ گنادوتروپین ها: ۱۶

۱-۱-۲-۲-۱ هورمون محرک فولیکولی ۱۶

۱-۱-۲-۲-۲ لوتروپین ۱۷

۱-۱-۲-۲-۳ آروماتاز ۱۸

۱-۱-۲-۲-۴ رشد و عملکرد فولیکولی در فاز غیر وابسته به کنترل گنادوتروپیک: ۱۹

۱-۱-۲-۲-۵ رشد و عملکرد فولیکولی در فاز وابسته به کنترل گنادوتروپیک: ۱۹

۱-۱-۲-۲-۶ مفهوم «بکارگیری» و«غلبه»: ۲۰

۱-۱-۲-۲-۷ نقش هورمون هیپوفیزی FSH در تکوین فولیکولی: ۲۰

۱-۱-۲-۲-۸ پنجره FSH: ۲۱

۱-۱-۲-۲-۹ مدل دو سلول- دو گنادوتروپین : ۲۲

۱-۱-۲-۲-۱۰ فرضیه «سقف» LH ۲۳

۱-۱-۲-۲-۱۱ نقش هورمون هیپوفیزی LH در تکوین فولیکولی: ۲۴
۱-۱-۲-۳ هورمون های تخمدان ۲۵
۱-۲ ناباروری ۳۰
۱-۲-۱ سندرم تخمدان پلی کیستیک: ۳۱
۱-۲-۲ اختلالات تکوین فولیکولی در PCOS: ۳۵
۱-۲-۳ نقش مولکول های چسبندگی سلولی در PCOS: ۳۷
۱-۲-۴ چاقی ،دیابت ملیتوس، عارضه های قلبی عروقی و PCOS: ۳۷
۱-۲-۵ مکانیسم مولکولی پیشنهاد شده برای PCOS ۳۹
۱-۲-۶ فاکتور های ژنتیکی و محیطی موثر در PCOS : ۴۰
۱-۳ آنزیم سیکلواکسیژناز ۴۲
۱-۳-۱ آنزیم سیکلواکسیژناز و متابولیت های حاصل از آن: ۴۲
۱-۳-۲ ساختار شیمیایی آنزیم سیکلواکسیژناز۲: ۴۳
۱-۳-۳ رسپتور های پروستاگلاندین ها: ۴۶
۱-۳-۴ فعالیت های بیولوژیکی پروستاگلاندین های حاصل از آنزیم سیکلواکسیژناز۲: ۴۷
۱-۴ روش های القای سندرم : ۵۵
۱-۴-۱ استروژن ها : ۵۵
۱-۴-۲ نور مداوم: ۵۶
۱-۴-۳ تستوسترون ها: ۵۶
۱-۴-۴ دهیدرواپی اندرستنه دیون: ۵۷
۱-۴-۵ آنتی پروژسترون ها: ۵۸
۱-۴-۶ استرس سرما: ۵۸
۱-۴-۷ تخریب سیستم لیمبیک: ۵۸
۱-۴-۸ تخریب آمیگدال : ۵۹

۱-۴-۹ پینئالکتومی: ۵۹
۱-۴-۱۰ آنتی آروماتاز ها : ۵۹
۱-۵ زهر زنبور عسل ۵۹
۱-۵-۱ خواص آنزیم های زهرزنبورعسل ۶۰
۱-۵-۲ خواص پپتیدهای زهرزنبور عسل ۶۱
۱-۵-۳ بررسی اثرات درمانی زهر زنبور عسل: ۶۵
۱-۵-۳-۱ اثرات ضد درد: ۶۵
۱-۵-۳-۲ اثرات ضد توموری: ۶۶
۱-۵-۳-۳ اثرات ضد التهابی: ۶۹
مواد و روش ها ۷۱
۲-۱ مواد مورد نیاز ۷۲
۲-۲ وسایل مورد نیاز ۷۳
۲-۳ طرح کلی ۷۴
۲-۴ القای سندرم تخمدان پلی کیستیک در رت ۷۴
۲-۴-۱ مراحل مقدماتی: انتخاب رت ها ۷۴
۲-۴-۲ روش تهیه و بررسی اسمیر واژینال ۷۵
۲-۴-۳ روش القای سندرم تخمدان پلی کیستیک در رت ۷۶
۲-۴-۵ روش تیمار حیوانات ۷۷
۲-۵ روش نمونه برداری بافتی ۷۷
۲-۵-۱ روش تثبیت نمونه ها ۷۷
۲-۵-۲ مرحله ی آبگیری نمونه ها ۷۸
۲-۵-۳ مرحله ی شفاف سازی نمونه ها ۷۸
۲-۵-۶ مرحله ی نفوذ پارافین به درون نمونه ۷۹

۲-۵-۷ مرحله ی قالب گیری نمونه ها ۷۹
۲-۵-۸ مرحله ی برش برداری قالب های پارافینی ۷۹
۲-۵-۹ روش چسباندن برش ها بر روی لام ۸۰
۲-۵-۱۰ پارافین زدایی ۸۱
۲-۵-۱۱ خارج نمودن حلال پارافین ۸۱
۲-۵-۱۲ آب دهی ۸۱
۲-۵-۱۳ رنگ آمیزی ۸۲
۲-۶ آنالیز هیستومورفومتریک و هیستومورفولوژیک ۸۳
۲-۷ رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ۸۴
۲-۷-۱ پارافین‌زدایی: ۸۴
۲-۷-۲ آبدهی: ۸۴
۲-۷-۳ بلوکه کردن پراکسید هیدروژن: ۸۴
۲-۷-۴ بازیابی آنتی‌ژنی : ۸۵
۲-۷-۵ بلوکه کردن پروتئین‌های غیر اختصاصی: ۸۵
۲-۷-۶ آنتی‌بادی اولیه: ۸۵
۲-۷-۷ آنتی‌بادی ثانویه: ۸۵
۲-۷-۸ محلول استرپتاویدین پروکسیداز: ۸۵
۲-۷-۹ رنگ آمیزی DAB : ۸۵
۲-۷-۱۰ رنگ آمیزی زمینه با هماتوکسیلین: ۸۶
۲-۷-۱۱ لامل‌گذاری : ۸۶
۲-۸ آنالیز آماری ۸۶
نتایج ۸۷
۳-۱ نتایج بررسی های متابولیک ۸۸

۳-۱-۱ تغییرات وزن بدن حیوانات گروه تجربی نسبت به گروه کنترل: ۸۸
۳-۱-۲ تغییرات وزن بدن حیوانات گروه تیمار شده با زهر زنبور عسل نسبت به گروه تجربی: ۸۸
۳-۱-۳ تغییرات وزن تخمدان حیوانات گروه تجربی نسبت به گروه کنترل: ۸۹
۳-۱-۴ تغییرات وزن تخمدان گروه تیمار شده با زهر زنبور عسل نسبت به تجربی: ۹۰
۳-۲ تغییرات سیکل استروس و اسمیر واژینال ۹۱
۳-۳ بررسی تغییرات CRP ۹۱
۳-۴ بررسی مورفولوژیک تخمدان ها: ۹۲
۳-۴-۱ بررسی و مقایسه ی مورفولوژیک تخمدان های گروه تیمار شده با استرادیول ولرات و گروه کنترل: ۹۲
۳-۴-۲ بررسی و مقایسه ی مورفولوژیک تخمدان های گروه پلی کیستیک تیمار شده با زهر زنبور عسل و گروه PCOS: ۹۴
۳-۵ بررسی و مقایسه ی میزان هورمون های استرادیول و پروژسترون و تستوسترون در گروه های کنترل و تجربی و تیمار شده با زهر زنبور عسل: ۱۰۰
۳-۶ بررسی نتایج مورفومتریک ۱۰۲
۳-۶-۱ نتایج مورفومتریک قطر لایه ی گرانولوزا در گروه های فولیکولی مختلف در حیوانات گروه پلی کیستیک و گروه کنترل: ۱۰۲
۳-۶-۲ نتایج مورفومتریک قطر لایه ی گرانولوزا در گروه های فولیکولی مختلف در حیوانات تیمار شده با زهر زنبور عسل و گروه پلی کیستیک : ۱۰۳
۳-۶-۳ نتایج مورفومتریک قطر کمپلکس اووسیت- کومولوس در حیوانات گروه پلی کیستیک و گروه کنترل: .. ۱۰۴
۳-۶-۴ نتایج مورفومتریک قطر کمپلکس اووسیت- کومولوس در حیوانات گروه تیمار شده با زهر زنبور عسل و گروه پلی کیستیک: ۱۰۵
۳-۶-۵ نتایج مورفومتریک قطر لایه غلاف فولیکولی در گروه تجربی و گروه کنترل: ۱۰۶
۳-۶-۶ نتایج مورفومتریک قطر لایه غلاف فولیکولی در گروه تیمار شده با زهر زنبور عسل و گروه تجربی:..... ۱۰۶
۳-۷ نتایج ایمونوهیستوشیمی ۱۰۷
۳-۷-۱ ایمونولوکالیزاسیون COX-2 در تخمدان گروه های کنترل و PCOS و تیمار شده با زهر زنبور عسل: ۱۰۷

بحث ۱۱۰
۴-۱ بیماری زایی آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ در اثر بیان غیر طبیعی و افزایش فعالیت متابولیت های حاصل از آن: . ۱۱۱
۴-۲ ارتباط التهاب و PCOS به عنوان یک اختلال متابولیک ۱۱۸
۴-۳ مکانیسم های اثرات ضد التهابی زهر و تاثیرات آن در بیان COX: ۱۲۴
۴-۵ مکانیسم پیشنهادی در این بررسی: ۱۲۴
۴-۶ تغییرات میزان گنادوتروپین ها و متابولیت های COX-2 ..... ۱۲۸
پیشنهادات: ۱۳۱
منابع ۱۳۲

بخش اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ دستگاه تولید مثلی ماده در پستانداران

۱-۱-۱ بافت شناسی دستگاه تولید مثلی ماده در پستانداران

دستگاه تولید مثلی ماده شامل یک جفت تخمدان و لوله ی تخمک بر[۱]، رحم و واژن می باشد. تخمدان ها به تعداد دو عدد، بادامی شکل و به صورت قرینه در قسمت قدامی کلیه ها قرار داشته و بوسیله ی رباطی به عضلات ناحیه ی کمری متصل هستند. سطح تخمدان ها به علت وجود فولیکول ها برجسته به نظر می رسد. تخمدان بالغ دارای پوشش مکعبی ساده است. اطراف تخمدان توسط یک لایه ی اپی تلیالی ژرمینال سنگفرشی یا مکعبی از جنس بافت پیوندی متراکم بنام تونیکا آلبوژینه[۲] محاط می شود. ناحیه هیلوس[۳] تخمدان را با اوویداکت مربوط می کند(Jonquiere, 2005). (شکل الف).

۱-۱-۲ تکوین دستگاه تولید مثلی ماده پستانداران

غدد تناسلی در مهره داران از حاشیه ی بالایی لایه ی احشایی[۴] صفحه ی مزودرم جانبی[۵]، از مزودرم حدواسط[۶] در موقعیت نیمه ی خلفی بدن جنین به صورت قرینه تشکیل می گردد. اولین پیش فرم غدد تناسلی به صورت دو نوار طولی و ضخیم شده از بافت پوششی مزودرمی حفره ی بدن درست در کنار روده بند پشتی مقابل همدیگر به وجود می آیند. تخمدان ها از نظر منشا فرقی با بیضه ها ندارند و هر دو از سلول های جنسی اولیه و مشتقات مزودرمی اند. در جوندگان سلول های جنسی اولیه مشتق از اندودرم کیسه زرده در E11 وارد این نوار های تناسلی[۷] می شوند و به صورت اووگونی در می آیند که به صورت مجموعه هایی جمع شده و در قشر تخمدان تجمع پیدا می کنند. نوار های تناسلی با ورود این سلول ها به لایه ی پوششی خود غدد تناسلی را بوجود می آورند. در رت تخمدان ها از روز E16 قابل تشخیص هستند.

---

[۱] Oviduct
[2] Tunica Alboginea
[3] Hilus
[4] Splanchnopleura
[5] Lateral Mesodermal Plate
[6] Intermediat Mesoderm
[7] Genital Ridges

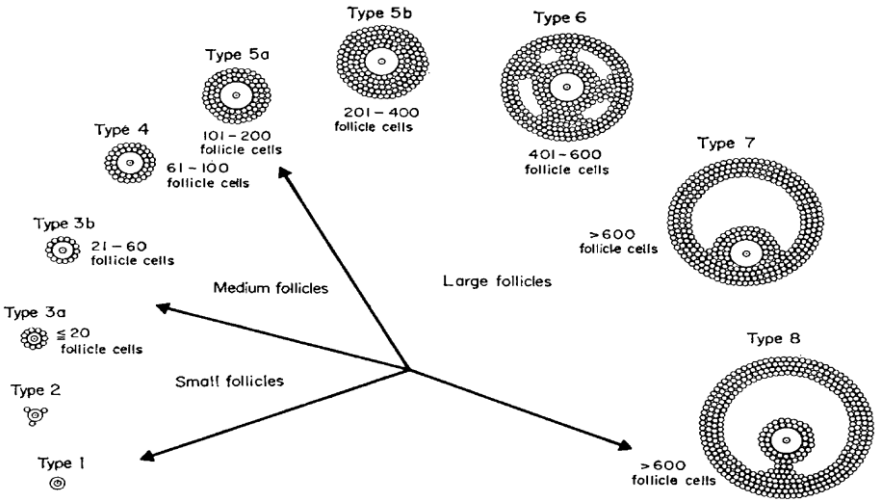
سلول های جنسی اولیه به سرعت شروع به تکثیر می کنند به طوریکه در روز E18.5 تعداد انها به ۸۵۰۰۰ عدد می رسد. تشخیص بافت تخمدان و اووسیت ها تنها پس از پایان فعالیت میتوتیک اووگونی هاامکان پذیر است. سلول های جنسی اولیه با توقف میتوز و ورود انها به دیپلوتن میوز تمایز می یابند. در روز E17 همه ی سلول های جنسی وارد میوز شده اند. این مجموعه های اووگونی لانه ی تخمکی نام دارند. تعدادی از سلول های سازنده ی لانه تخمکی از بین می روند و بقیه ی آنها به تدریج از لانه های تخمکی آزاد می شوند و به مرور اطراف این سلول ها را یک ردیف سلول های فولیکولی می پوشاند. با تجمع سلول های فولیکولی در پیرامون آنها، این سلول ها اووسیت اولیه نامیده می شوند(پریور، ۱۳۸۳; van & Cappellen 1998,).

۱-۱-۳ فولیکول زایی[1]

تکوین فولیکولی درجوندگان بسیار مشابه انسان است. در زمان تولد تخمدان موش صحرایی حاوی طناب های جنسی و اووگونی هاست. فولیکول های آغازین در روز سوم بعد از تولد شکل می گیرند و در طول ۳ هفته بعدی موج نخست تکوین فولیکول های بدوی به فولیکول های آنترال صورت می گیرد. فولیکول های ثانویه در روز هفتم در تخمدان قابل مشاهده می باشند. بلوغ یا اولین استروس[2] در حدود روز ۳۴ بعد از تولد اتفاق می افتد. رت های ماده ۱۴الی۲۸ ساعت پس از زایمان می توانند به مرحله ی بحران جنسی یا حرارت جنسی[3] وارد شود. به این حالت اصطلاحا postpartum می گویند و در حال شیردهی و نگهداری از زاده های خود توانایی بارداری را دارند. در هر بار زایمان تعداد زاده ها در رت نژاد ویستار ۱۰تا ۱۲ سر است و با افزایش سن این تعداد کاهش می یابد. در ساعت ۲ تا ۴ صبح روز استروس تخمک گذاری رخ داده و در ساعت حدود ۱۰ صبح علایم آن روز قابل رویت است. بعد از عمل جفت گیری ماده ای واکسی و سفید رنگ بنام پلاک جفت گیری[4] به مدت ۱۲تا ۲۴ ساعت قابل رویت است. بعد از اولین تخمک گذاری سیکل های تخمدانی آغاز می شوند. در رت های نژاد ویستار و آمستردام اولین سیکل ها ۷ الی ۸ روز طول می کشد. چرخه ی استروس طبیعی تا حدود ۱۰ تا ۱۲ ماهگی ادامه می یابد و بعد از آن سیکل ها نامنظم و طولانی می شود. از

[1] Folliculogenesis
[2] estrous
[3] Sex Heat
[4] Coupulatory Plug

۱۲ الی ۱۵ ماهگی به بعد وارد استروس پایدار می شوند و به دنبال آن مرحله دی استروس مزمن و نهایتا پایان استروس و ایجاد حالت anestrous رخ می دهد(McGee et al, 2000). زمانیکه سیکل تخمدانی در رت ها در سن یک سالگی متوقف می شود تعداد ۸۰۰ فولیکول(۱۳٪ تعداد کل انها در زمان اولین تخمک گذاری) متحمل تخمک گذاری شده و بقیه دچار آترزی شده اند. فولیکول های بدوی[1] با قطر ۱۷ تا۲۰ میکرومتر و دو یا سه لایه سلول های فولیکولی سنگفرشی پهن در بخش کورتکس قابل مشاهده اند. هر کدام دارای یک اووسیت اولیه با قطر ۱۱تا ۱۵ میکرومتر هستند که در مرحله ی پروفاز میتوز متوقف شده اند. گاه فولیکول های مراحل گذار، دارای هر دو نوع سلول سنگفرشی و مکعبی هستند. غشای پایه یا غشای Slavjansky در این فولیکول ها قابل رویت است که از جنس کلاژن ۴ و لامینین و فیبرونکتین است. قطر فولیکول متاثر از قطر اووسیت است. بزرگترین فولیکول ها در این مرحله دارای ۲۵-۲۹ سلول گرانولوزا و اووسیتی به قطر۲۸.۵ میکرومتر هستند. تعداد محدودی از فولیکول های اولیه که با سلول های استرومایی



شکل۱-۱: در رت فولیکول های تخمدانی به سه دسته ی تقسیم می شوند: کوچک، متوسط و بزرگ. این تقسیم بندی بر اساس تعداد لایه های سلول های گرانولوزای اطراف اووسیت در بزرگترین برش از هر فولیکول حاصل می شود(Torben Pedersen And Hannah Peters, 1968).

مثل سلول های تک تمایز نیافته[2] احاطه شده اند، قابل مشاهده اند. برخی از فولیکول های اولیه را می توان با مشاهده ی سلول های گرانولوزای در حال تکثیرشان تشخیص داد. فولیکول های ثانویه یا پیش آنترال[3] دارای اووسیت هستند که

[1] Primordial follicles
[2] Interstitial Cells
[3] Preantral Follicle Or Secondary Follicle

هسته ای مرکزی و ژرمینال وزیکول(GV)[1] و تعداد زیادی هستک دارد. اندازه ی اووسیت با تغییر اندازه ی فولیکول ثابت باقی می ماند. در فولیکول های کوچک تر ضخامت لایه ی گرانولوزا ۲الی ۳ لایه است. زوناپلوسیدا در این عده فولیکول ها به وضوح قابل رویت است. سلولهای گرانولوزا شدیدا فعالیت میتوتیک از خود بروز می دهند که نشانه ی تشخیصی آنها محسوب می شود. لذا در نهایت یک اپیتلیوم مطبق ۲ الی ۱۲ لایه ساخته می شود. زمانی که این لایه دارای ۶ الی ۱۲ لایه سلول و قطر ۲۲۵ میکرومتر دارد، لایه ی تک داخلی[2] و آنتروم شروع به تشکیل می کند. سلول های تک خارجی[3] مسطح تر بوده و به صورت متحدالمرکز درون شبکه ای از فیبرهای پیوندی قرار گرفته و عروقی اند. بزرگترین فولیکول های پیش آنترال سالم وارد مرحله ی آنترال کوچک اولیه می شوند، سایزشان با تکثیر سلول ها و به هم پیوستن نهایی آنتروم بزرگتر شده و مورفولوژی فولیکول تغییر بارزی می یابد. قطر اووسیت به ۷۰ میکرومتر می رسد. سلول های گرانولوزای محیط اووسیت به هم بسیار نزدیک شده و توده ی تخمکی[4] را تشکیل می دهند. بقیه ی سلول های گرانولوزا که به غشای پایه نزدیک تر هستند سلول های گرانولوزای دیواره ای [5] را می سازند. فولیکول های آنترال سالم در مراحل پایانی به قطر ۵۰۰ میکرومتر می رسند. اووسیت در وسط قرار دارد ولی GV به کناری رفته اند. سلول های گرانولوزای احاطه کننده ی اووسیت تشکیل حلقه ای به نام کرونا رادیاتا می کنند(Boubekri et al., 2007). فولیکول های در آستانه ی تخمک گذاری در مرحله ی استروس حجم زیادی از کورتکس را اشغال می کنند و به سطح آزاد گناد نزدیک تر می شوند. دارای اووسیت ثانویه اند که نشانه ی متافاز میوز دوم است.کمپلکس اووسیت – کومولوس(COC)[6] ناحیه ی ضخیمی برامده به سمت آنتروم می سازد. اتصالات گرانولوزا ها با هم کاهش یافته و غشای پایه ی فولیکولی در حال محو شدن است و عروق خونی به صورت عمیق تری وارد لایه تک شده اند. در سطح تخمدان این ناحیه مسطح می شود و اپیتلیوم ژرمینال آن سنگفرشی شده و اوولاسیون رخ می دهد. در رت ها هر ۵ روز این اتفاق می افتد. دراین زمان میتوان COC را در اوویداکت یافت. سلول های فولیکولی دیواره ای و نیز سلول های تک در تخمدان باقی مانده و تشکیل جسم زرد می دهند. در جسم زرد سلول های گرانولوزا برای اولین بار در تماس با

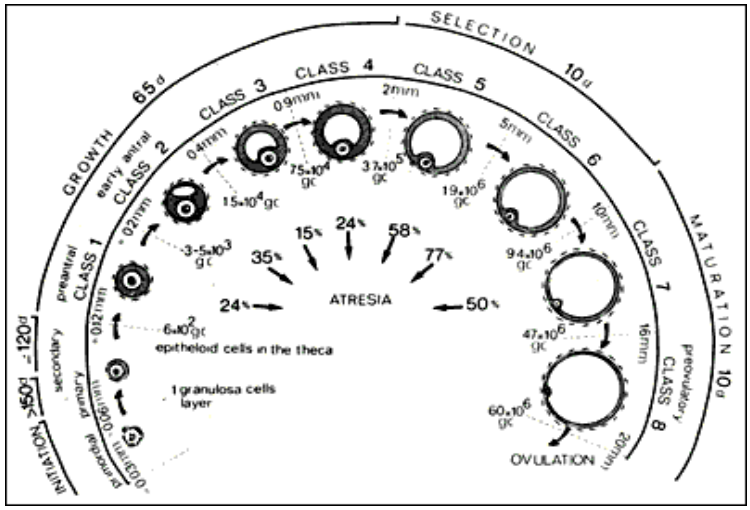
[1] Germinal Vesicle
[2] Thecal Interna
[3] Theca Externa
[4] Cumulus Oophorous
[5] Mural
[6] COC= Cumulus-Oocyte Complex

عروق خونی قرار می گیرند. در فولیکول هایی که دچار آترزی می شوند سلول های پیکنوتیک در لایه ی گرانولوزا قابل رویت است. پس از ان اووسیت رو به انحطاط گذاشته و GV حذف شده و لایه ی گرانولوزا چروکیده می گردد. در مراحل بعد اووسیت رو به تکه تکه شدن می گذارد. کل مرحله ی آترزی در حیوانات کوچکی مانند رت ۳-۵ روز است(Cappellen & van, 1998).

در انسان نیز فولیکول زایی در کورتکس تخمدان رخ داده و شامل چهار مرحله ی بکارگیری فولیکول های بدوی از مخزن فولیکولی، رشدونمو فولیکول پره آنترال، انتخاب و رشد فولیکول غالب و آترزی فولیکول است و با اوولاسیون و یا آترزی به پایان می رسد. فولیکول های آنتروم دار که بعد از بلوغ تشکیل می شوند و همه ی آنهایی که قبل از بلوغ بوجود آمده بودند در مراحل رشد و نموی خود دچار آترزی می شوند. فولیکول زایی در انسان پروسه ی زمان بری است یک سال نیاز است تا یک فولیکول بدوی به مرحله تخمک گذاری برسد(Williams & Erickson, 2008).

۱-۱-۴ زمان شناسی فولیکول زایی:

در فولیکول زایی دو مرحله ی قابل تفکیک مشاهده می شود: فاز مستقل از گنادوتروپین ها و وابسته به گنادوتروپین ها.



شکل۱-۲: زمان بندی فولیکول زایی طبیعی در انسان. کلاس ۱: فاز پیش آنترال یا فاز مستقل از گنادوتروپین ها که با رشد و تمایز اووسیت همراه است و بواسطه ی مکانیسم های اتوکرین و پاراکرین تنظیم می شود. کلاس ۸-۳ : فاز آنترال یا وابسته وابسته به گنادوتروپین ها که با رشد و افزایش سایز کل فولیکول تا حدود ۲۵ الی ۳۰ میلیمتر همراه است و با مکانیسم های اتوکرین و پاراکرین وهمچنین با اثر هورمون های FSH [1] وLH کنترل می شود، شامل فولیکول های آنترال کوچک، متوسط، بزرگ، و فولیکول بزرگ پیش اوله است. در کلاس ۵ فولیکول غالب انتخاب می شود(Williams & Erickson, 2008).

[1] Follicle Stimulation Hormone

۱-۱-۵ تخمک گذاری[1]:

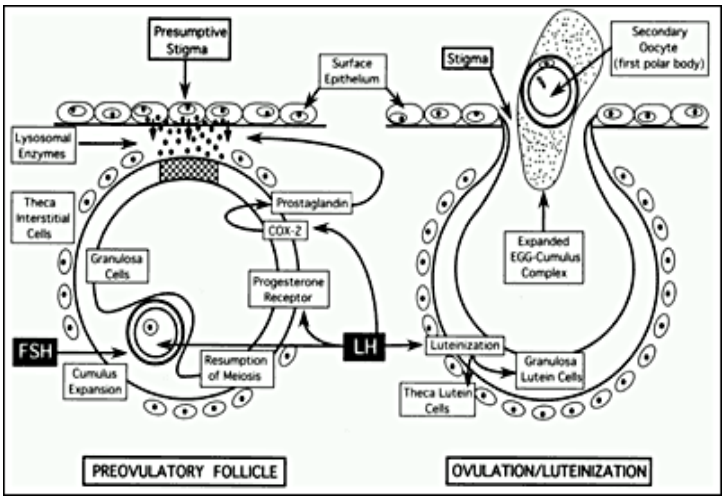
در انسان ۱±۱۴ روز پس از آغاز یک سیکل منظم ۲۸ روزه فولیکول پیش اوله، تخمک بالغ خود را به همراه سلول های کومولوس اطرافش آزاد می نماید، به این عمل که بخشی از آن به علت افزایش ناگهانی حجم مایع آنتروم است تخمک گذاری اطلاق می شود که نیازمند مجموعه ای از سیستم های اندوکرین و سیگنال های ایمنی و فاکتور های پاراکرین خارج تخمدانی بوده و همه ی سلول های فولیکول پیش اوله آمادگی پاسخگویی به این سیگنال ها را دارند. فولیکول گراف در آخرین ساعات به سرعت وسیع گردیده در سطح تخمدان به شکل یک تاول برجسته می گردد. در محل برجستگی سطح تخمدان کشیده و نازک می شود. در قله این تاول یک نقطه بدون رگ خونی و روشن به نام خال[2] قابل ملاحظه است. هنگامی که بزرگی تاول به حد نهایی خود رسید جدار تخمدان در محل خال می ترکد. اما به نظر نمی رسد تنها فشار داخل فولیکول سبب این گسستگی شود بلکه هورمون LH و پروستاگلاندین ها در این امر دخیل اند. در زمان اولین تخمک گذاری رت حدود ۶۰۰۰ فولیکول در تخمدان وجود دارد. این تعداد در انسان ۴۰۰۰۰۰ است. رت ها در هر ۴ الی ۵ روز سیکل خود حدود ۱۲ عدد اووسیت از هر دو تخمدان آزاد می کند در حالیکه در انسان فقط یک تخمدان در هر ماه تخمک گذاری انجام می دهد(پریور،۱۳۸۳; Boubekri et al., 2007).

۱-۱-۶ تشکیل جسم زرد[3]

پس از تخمک گذاری دیواره ی فولیکولی به سمت تشکیل جسم زرد سوق می یابد که یک غده اندوکرین ترشح کننده ی پروژسترون و استرادیول می باشد. تحلیل رفتن غشای پایه که سلول های گرانولوزا را از غلاف فولیکولی جدا می کند، تشکیل کلات های فیبرین درون آنتروم، سست شدن بافت پیوندی و هجوم سلول های خونی در این مرحله مشاهده می شود. سلول های سازنده ی جسم زرد عبارتند از سلول های گرانولوزا و تک داخلی و خارجی و سلول های خونی. سلول های گرانولوزای لوتئینی شده یا "بزرگ" و سلول های غلاف فولیکولی لوتئینی شده یا "کوچک" دو جمعیت متمایز از سلول ها در جسم زرد انسان را تشکیل می دهند. سلول های گرانولوزا پس از تخمک گذاری دارای

[1] Ovulation
[2] Stigma
[3] Luteinization

سایزهای بزرگی در حد ۳۵ مایکرومتر می شوند که در این مرحله سلول های گرانولوزایی - زرده ای[1] نام می گیرند. این سلول های بزرگ پس از تحریک ابتدایی توسط LH بطور مداوم پروژسترون ترشح می کنند و ۱۰ روز بعد تحلیل می روند. سلول های کوچک به تنهایی مسئول تولید پروژسترون پس از ۱۰ روز فاز لوتئال و طی حاملگی می باشند(صفدریان،۱۳۸۳). این سلول ها حاوی میزان بالایی از شبکه ی اندوپلاسمی صاف و میتوکندری های با تیغه ها توبولار و کلاستر های بزرگی از چربی و زرد رنگ اند که دارای کلاسترهای کلسترولی در سیتوپلاسم اند. در سلول های این مرحله بیان بالایی از StAR[2] و P_{450SCC}[3] و $P_{450AROM}$[4] وجود داردکه توانایی ساخت پروژسترون و استرادیول را به سلول ها می دهد. LH برای حفظ توانایی ساخت استروئیدها در این سلول ها نیاز است(Williams & Erickson, 2008).



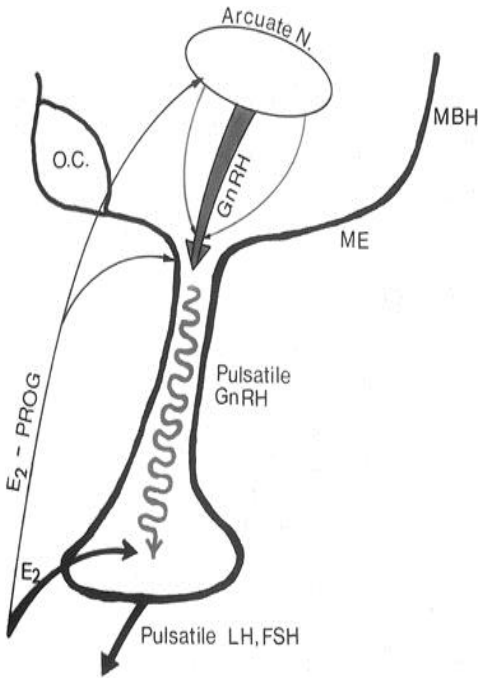
شکل۱-۳: مکانیسم های سلولی تخمک گذاری بواسطه ی افزایش میزان هورمون های LH وFSH در فاز پیش از تخمک گذاری. متابولیت های حاصل از COX-2 به عنوان لیگاندهای رسپتور PPAR عمل کرده و سبب القای اندوتلین ۲ و اینترلوکین ۶ و پروتئین کیناز ۲ وابسته به cGMP میشود که حضورشان برای تخمک گذاری الزامی است(Williams & Erickson, 2008).

[1] Luteogranolusa
[2] Steroidogenic Acute Regulattory Protein
[3] P450 Side Chain Cleavege
[4] P450 Aromatase

۱-۱-۲ محور هورمونی هیپوتالاموس_ هیپوفیز_ تخمدان [1]

۱-۱-۲-۱ هورمون آزادکننده ی گنادوتروپین ها[2]

هورمون آزادکننده ی گنادوتروپین ها هورمون هیپوتالاموسی تنظیم کننده عملکرد تولید مثل است. اولین بار این هورمون در سال ۱۹۷۱ توسط Guillemin و Schally کشف شد. یک دکاپپتید است که همانند چندین پپتید دیگر مغز به صورت بخشی از یک پپتید پیش ساز بزرگ به نام پپتید مرتبط با GnRH با ۵۶ اسید آمینه ساخته می شود. ساختمان آن در تمامی پستانداران و در هر دو جنس یکسان است. ادامه ترشح گنادوتروپین ها به تماس هیپوفیز با الگوی نوسانی ترشح GnRH نیازمند است. تولید نوسانی GnRH همزمان با فعالیت الکتریکی در هسته ی قوسی مغز رخ می دهد که اصطلاحا ژنراتور مولد GnRH نامیده می شود (Schally et al. 1971).



شکل ۱-۴ :در پریمات ها ژنراتور پالس GnRH درون هسته های قوسی هیپوتالاموس مکان یابی شده است. پالس های GnRH به سیاهرگ های پورتال هیپوفیزی که GnRH را به هیپوفیز به منظور تحریک پالسی LH و FSH منتقل می کند.این گنادوتروپین ها فولیکول زایی و ترشح استروئیدو پپتیدرژیک را از تخمدان ها تحریک می کنند. فعالیت GnRH و LH و FSH توسط هورمون های تخمدانی مانند استرادیول و پروژسترون کنترل می شود..(Schally et al. 1971). MBH, Mediobasal Hypothalamus; ME, Median Eminence.

[1] hypothalamic-pituitary-gonadal axis = HPG axis
[2] Gonadotrophin Releasing Hormone=GnRH

۱-۱-۲-۲ گنادوتروپین ها:

FSH و LH دو هورمون هیپوفیز قدامی اند که عملکرد گنادها را کنترل می کنند. هر دو هورمون به وسیله ی سلول های یکسان در هیپوفیز ساخته و ترشح می شوند. ثابت شده است که فقط یک هورمون هیپوتالاموسمی(یعنی GnRH) بر هر دو هورمون اثر می کند. هر هورمون حاوی دو زنجیره است. ساختار زنجیره ی آلفا درتمام گلیکوپروتئین های هیپوفیز مشابه است ولی زنجیره های بتا منحصر به فرد بوده و پس از اتصال به زنجیره آلفا، عملکرد هورمونی اختصاصی را تعیین می کند. گنادوتروپین ها گلیکوپروتئین هایی با وزن مولکولی ۳۰۰۰۰ دالتون هستند و فوروکتوز، مانوز، گالاکتوز، استیل گلوکز آمین و N استیل نورآمینیک اسید بخش هیدروکربنی آنها را می سازد. تعداد اسید سیالیک در هورمون های گلیکوپروتئینی بسیار متنوع است(۲۰ عدد در HCG، ۵ عدد در FSH و فقط یک یا دو عدد در هورمون لوتئینی کننده ی انسانی(hLH). این تفاوت ها عامل اصلی تنوع در نقاط ایزوالکتریک گنادوتروپین است که موجب تفاوت در وزن مولکولی و فعالیت بیولوژیک هورمون ها می باشد. هر چه محتوای اسید سیالیک هورمون بیشتر باشد نیمه عمر بیولوژیک هورمون بیشتر است و لذا نیمه عمرگنادوتروپین های ادراری بیشتر از هیپوفیزی (صفدریان, ۱۳۸۳).

۱-۱-۲-۲-۱ هورمون محرک فولیکولی

یک پروتئین گلیکوزیله با وزن مولکولی ۲۸۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون است؛ زنجیره ی آلفا حاوی ۹۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۱۴۶۰۰ دالتون و پنج پیوند دی سولفیدی است. زنجیره ی بتا حاوی شش پیوند دی سولفیدی است. همانند زنجیره ی آلفا، اولیگوساکاریدها از انتهای آمینی به دو مولکول آسپارژین متصل اند. نیمه عمر این هورمون از ۹۵ تا ۲۵۰ دقیقه و برابر با ۵ برابر نیمه عمر LH است. در تخمدان به گیرنده های واقع بر سلول های گرانولوزا متصل شده و از طریق مسیر پروتئین کیناز وابسته به cAMP عمل می کند.اتصال آن سبب افزایش رشد سلول های گرانولوزای فولیکول اولیه می شود. همچنین در رشد تخمک های پیش اووله موثر است. اتصال آن به فولیکول های آنترال و پیش اووله فعالیت آروماتاز ها را افزایش می دهد که این عمل پس از تحریک LH وافزایش فعالیت 17a-hydroxylare cytochrome P450 و محتوای mRNA ای رخ می دهد که تولید آندروژن ها را افزایش می دهد. آندرژن ها به