

آنالوگ GnRH موجب گسترش اثرزری در اجتماع فولیکولهای پیش‌انترومی تخمدان و متعاقباً "فعال نمودن اووسیت موجود در فولیکولهای اترتیک به از سرگیری میبوز میگردد .

دکتر رجبعلی صدرخانلو *

خلاصه :

بمنظور مشاهده تاثیر مستقیم GnRH_a در ایجاد تغییرات ساختمانی در فولیکولهای تخمدانی از موش رات ماده نابالغی که در سن ۲۳-۲۱ روزگی هیپوفیزکتومی شده و همزمان کپسول حاوی DES در زیر جلد ناحیه بغل حیوان کار گذاشته شده بود بعنوان مدل مورد استفاده قرار گرفت. هر روز بعد از عمل جراحی حیوانات مذکور در قفسهای جداگانه‌ای گروه بندی و نگهداری شدند . روز بعد بهر گروه روزانه یکبار و بسته به نوع آزمایش ۱-۳ روز متوالی هورمون GnRH_a و یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) تزریق گردید . مطالعه میکروسکپی برشهای بافتی نخمدان موشهای گروه شاهد در روز چهارم از عمل هیپوفیزکتومی نشان میدهد که در حدود ۳۶/۵٪ از کل فولیکولهای پیش انترومی تخمدان اترتیک بوده و بعد از ۲۴ ساعت از تزریق سرم فیزیولوژی به گروه شاهد با جزئی افزایش به ۴۰٪ رسید و حال آنکه در تخمدان موشهایی که ۲۴ ساعت قبل هورمون GnRH_a دریافت داشته بودند تعداد فولیکولهای اترتیک در مقایسه با گروه شاهد افزایشی در حدود ۲۵٪ را نشان میدهد و با وجود اینکه تمام ابعاد فولیکولی متأثر به GnRH_a گشته بودند ولی اثر عمده هورمون مذکور بیشتر در فولیکولهای با ابعاد بزرگتر از ۲۰۰ میکرومتر محسوس مییاشد .

* گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه ارومیه

ضمناً " مطالعه میکروسپکی بررسی حالات اووسیت نشان داده است که در حدود ۹۵٪ از اووسیت‌های موجود در فولیکول‌های پیش انترومی تخمدان موش‌های گروه شاهد در مرحله دیکتیوتن قرار دارند و حال آنکه تعداد قابل ملاحظه‌ای (۴۰٪) از اووسیت‌های موجود در فولیکول‌های تخمدانی موش‌هایی که ۲۴ ساعت قبل هورمون دریافت داشته بودند فعال گشته و تقسیم میبوزی خود را از سر گرفتند و تکرار تزریق هورمون مذکور برای روزهای دوم و سوم منجر به تحریک و فعال شدن اووسیت‌های بیشتر نگردید .

در ارتباط با تعداد اووسیت‌های فعال شده در ابعاد مختلف فولیکولی داده‌ها نمایانگر وجود درصد خیلی پائینی از اووسیت‌های فعال شده در گروه شاهد میباشد و اغلب این نوع اووسیت‌ها متعلق به دسته فولیکول‌های با ابعاد بین ۳۰۰ - ۲۰۰ میکرومتر میباشد که به ۵٪ از کل فولیکول‌ها مذکور بالغ میگرددند و در مقابل، در گروه GnRHa دریافت داشته درصد اووسیت‌های فعال شده در فولیکول‌های با ابعاد فوق‌الذکر به ۶۰٪ از کل فولیکول‌های تخمدانی افزایش پیدا نمود . بررسی پیشرفت مراحل مختلف تقسیم میبوزی نشان میدهد که متعاقب ۲۴ ساعت از تزریق GnRH agonist ۶۷٪ از کل اووسیت‌های فعال شده در مرحله GVBD و تنها ۸/۹٪ در مرحله کلیواژ هستند و حال آنکه در روزهای دوم و سوم از تزریق هورمون درصد تخم‌های شکافته شده بترتیب به ۵۶٪ و ۷۵٪ از کل اووسیت‌های فعال شده بالغ گردیدند .

مقدمه

هاریس در سال ۱۹۵۵ گزارش نمود که فعالیت ترشحی گونادوتروپین‌ها توسط اندوهیپوفیز بوسیله فاکتور مترشحه از هیپوتالاموس کنترل میگردد (۳۴) پس از جدا نمودن فاکتور مذکور از هیپوتالاموس گوسفند و خوک و مشخص ساختن ساختمان شیمیایی دکاپتیدی آن (۷۴،۵۹،۷) محققین مختلف موفق به سنتز آن بنام آنالوگ GnRH و یا به اختصار GnRHa گردیدند بطوریکه امروزه آنالوگ‌های متعددی از هورمون مذکور ساخته شده که بعضاً " بادوامتر و اثرش بمراتب قویتر از GnRH طبیعی بر روی بافت‌های مستعد است (۷۵،۵۴) قابل ذکر اینکه امروزه در کنار آنالوگ‌های GnRH متضاد Antagonist آنها نیز سنتز نموده‌اند (۱۷) که تقریباً " تهی از فعالیت هورمونی بوده و تنها از طریق رقابت با GnRH در اتصال به گیرنده‌های سلولی اعمال نفوذ نموده

و فعالیت هورمون مذکور را بلوکه میسازد (۴۲). با در دسترس قرار گرفتن انالوگهای متعدد از هورمون GnRH مراکز تحقیقاتی متعددی توجه خود را بمنظور روشن ساختن اثرات آن در اندامهای مختلف بدن بویژه دستگاه تناسلی پستانداران معطوف داشته‌اند. ابتدا تصور میشد که هورمون مذکور تنها از طریق تاثیر مستقیم بر روی سلولهای بازوفیلی غده ادنوهیپوفیز قادر است اعمال محرک و یا ممانعت کننده خود را اجرا نماید ولی متعاقب انتشار مقاله‌ای مبنی بر اینکه GnRHa از افزایش وزن تخمدان و رحم موش رت نابالغ هیپوفیزکتومی شده در جوار هورمون HCG جلوگیری مینماید (۷۱) احتمال داشتن اثرات خارج از هیپوفیزی هورمون مذکور مطرح گردید و در این رابطه استفاده از موش رت ماده نابالغ هیپوفیزکتومی شده بعنوان مدلی برای مشاهده تاثیر مستقیم و خارج از هیپوفیزی GnRHa در روی اندامهای مستعد متداول گردید. گزارشات متعدد وجود گیرنده‌های سلولی ویژه‌ای برای هورمون مذکور در اندامهایی نظیر کبد، طحال، قشر غده فوق کلیه، قلب، ریه، بیضه و تخمدان با ثبات رسانیده است. (۵۸، ۳۶). بخصوص در مورد تخمدان وجود گیرنده‌های مذکور را در سلولهای گرانولوزا (۶۹، ۴۶) سلولهای جسم زرد (۱۶) و سلولهای تکی و بینابینی (۵۷) گزارش نموده‌اند.

بطور کلی گزارشات انتشار یافته در رابطه با تاثیر هورمون GnRHa در فعالیتهای تخمدانی حاکی از وجود دو نوع تاثیر محرک و ممانعت کننده میباشد. از جمله اعمال ممانعت کننده آن میتوان تقلیل گیرنده‌های ویژه هورمونهای FSH، LH، PRL در روی سلولهای مستعد فولیکولهای تخمدانی (۷۱، ۵۰، ۴۹، ۴۳)، کاهش فعالیت سنتزی استروژن توسط سلولهای گرانولوزا (۴۸، ۴۱) پروژسترون توسط سلولهای جسم زرد (۳۵، ۱۶) و اندروژن توسط سلولهای تکی و بینابینی (۱۴) و بخصوص ممانعت از رشد فولیکولهای تخمدانی (۸۶) و بالاخره مهار تجمع cAMP توسط سلولهای گرانولوزا در محیط کشت In Vitro را نام برد (۵۲، ۵۱).

در مقابل تاثیرات مهاری فوق‌الذکر گزارشات متعددی در رابطه با اثرات محرک هورمون مذکور بر روی فونکسیون و فعالیتهای متابولیکی تخمدان انتشار یافته است بعنوان مثال هورمون مذکور موجب تحریک اووسیتها به از سرگیری میوز (۳۹، ۲۹، ۲۸، ۲۳، ۴) تخمک‌گذاری توسط موش رت هیپوفیزکتومی شده متعاقب تزریق PMSG (۴۴، ۱۸) و تحریک افزایشی فعالیت آنزیم ۲۵- α هیدروکسی استروئیدی هیدروژناز (20- β -OH-SDH)

که پروژسترون فعال را به نوع کمتر فعال بنام ۲۰- β هیدرو پروژسترون (P-OH- & 20-) مبدل میسازد (۴۷، ۴۸)، آزاد سازی اسید آراشیدونیک توسط سلولهای گرانولوزا موش رات در محیط کشت که بعنوان پیش ساز پروستاگلاندینها میباشد (۶۰) و تولید پروستاگلاندینها بویژه نوع E₂ در کشت سلولهای گرانولوزای موش رات (۱۵). افزایش تولید و ترشح فعال کننده پلاسمینوژن توسط سلولهای گرانولوزا (۶، ۸۴، ۸۵) و بالاخره افزایش فعالیت آنزیم فسفودی استراز که موجب تخریب CAMP میگردد (۴۷) را نام برد.

در مطالعه اخیر با استفاده از موش رات ماده نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول DES تاثیرات مهاری و محرک هورمون GnRHa از نظر ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در ساختمان بافتی فولیکولهای پیش انترومی تخمدان در طی ۱-۳ روز از تزریق هورمون مذکور مورد بررسی میکروسکپی قرار گرفت.

مواد و روش کار

موش رات ماده نابالغ نژاد Sprague Dawley (SD) در سن ۲۳-۲۱ روزگی بوسیله کمپانی جانسون (Bridgview Illinois) هیپوفیزکتومی شده و در همان زمان کپسول حاوی ۱۰ میلیگرم دی اتیل استیل بسترول (DES) در زیر جلد ناحیه بغل حیوان کار گذاشته شد حیوانات فوق الذکر سه روز بعد از عمل تحویل آزمایشگاه گردید و بلافاصله گروه بندی شده و هر گروه در قفس جداگانه و در شرایط یکسان نگهداری شدند. بین ساعت ۱۱-۱۳ روز بعد (روز چهارم از عمل) به گروههای مورد آزمایش روزانه یکبار و بمدت ۱-۳ روز متوالی هورمون GnRHa بفرمول $\text{D-Trp}^6\text{-Pro}^9\text{-(Des-Gly}^{10}\text{)-Ethylamide}$ و یا بعنوان شاهد تنها سرم فیزیولوژی تزریق گردید. مقدار تزریق روزانه ۱۰۰ ug از هورمون در ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و بصورت زیر جلدی و یا داخل صفاقی صورت گرفت.

حیوانات گروههای مختلف بسته بنوع آزمایش بعد از ۱-۳ روز از آخرین تزریق بطریقه قطع نخاع گردنی گشته و تخمدان آنها را بلافاصله از بدن جدا و در سرم فیزیولوژی سرد قرار داده و با استفاده از استرئومیکروسکوپ بافتهای اطرائی را از تخمدان جدا و تخمدانهای پاکیزه را بمدت چهار ساعت در حرارت آزمایشگاه در محلول ثبوتی بوئن

قرار داده و سپس نمونه‌های بافتی ثابت شده را جهت طی مراحل پاساژ ابتدا از ظروف حاوی الکل با درجات صعودی عبور داده و بمنظور شفاف نمودن بافتها از دو ظرف حاوی گزلیل هر کدام بمدت نیم ساعت استفاده گردید و سپس برای آغستگی بافت با پارافین از دستگاه پارافین گیری در حرارت ۵۸ درجه و با استفاده از خلاء بمدت نیم ساعت استفاده شد و در پایان تخمدانها را در قالبهای مخصوص قالب گیری و یا میکروتوم دستی برش ممتد تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین و ائوزین برشها رنگ آمیزی گردیدند (جهت آشنائی بیشتر یا تکنیک فوق الذکر به مقاله شماره ۷۳ مراجعه گردد) .

مطالعه میکروسکپی برشهای بافتی تهیه شده جهت بررسی موارد زیر انجام گرفته

است .

الف : مشاهده حالت فولیکولها (سالم یا اترتیک)

ب : مشاهده حالت اووسیت (در حالت دیکتیوتن (GV) و متافاز I (GVBD)

جسم قطبی (PB) ، متافاز II (Met II) شگافتگی (Cleaved)

ج : بررسی ابعاد فولیکول

توضیح اینکه :

۱- همانند تجربیات قبلی (۷۲، ۷۳) مشاهده تعداد ۱۰ عدد و یا بیشتر هسته پیکنوزه در لایه گرانولوزای بزرگترین مقطع از فولیکول بعنوان فولیکول در حال تحلیل محسوب میگردد و در مورد فولیکولهای با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرومتر حالت دژنراسیون اووسیت مثل تغییر شکل حدود اووسیت و پرده شفاف ، مجاله شدن هسته اووسیت ، کنار رانده شدن هسته سلولی و بالاخره مشاهده حفره پیش رس در لایه گرانولوزا بعنوان علائم اترزی در نظر گرفته شد .

۲- جهت اندازه گیری ابعاد فولیکولهای تخمدانی با استفاده از لنز چشمی مدرج از پرده بازال یکطرف تا پرده بازال طرف مقابل بزرگترین مقطع از فولیکول اندازه گرفته میشود و مواردیکه برش فولیکول حالت کروی نداشته باشد میانگین دو قطر بزرگ و کوچک آن در نظر گرفته میشود .

۳- پس از اندازه گیری قطر فولیکولهای تخمدانی ، دستجات فولیکولی را جهت تسهیل در توجیه مطالعات میکروسکپی در ابعاد مختلف همانند کوچکتر از ۱۰۰ میکرومتر،

۱۰۰-۲۰۰ و ۲۰۰-۳۰۰ و ۳۰۰-۴۰۰ میکرومتر گروه بندی نموده و در موارد استثنائی مشاهده یک الی دو فولیکول بزرگتر از ۴۰۰ میکرومتر را هم در همان گروه چهارم منظور می نمایند.

۴- اووسیت های کاملاً " رشد کرده براساس مراحل پیشرفته تقسیم سلولی نام گذاری گردیدند بطوریکه:

الف: اووسیت در مرحله GV به اووسیتی اطلاق میگردد که هسته آن در مرحله دیکتیوتن از پروفاز ۱ بوده و غشاء هسته کاملاً " واضح و هستک مشخص است.

ب: اووسیت در مرحله GVBD به اووسیت فعال شده اطلاق میگردد و آن حالتی است که هستک و غشاء هسته محو گشته و کروماتین به صورت کروموزوم های متراکم درآمده است.

ج: مرحله PB مشاهده جسم قطبی به همراه اووسیت میباشد و گاهی علاوه بر جسم قطبی کروموزومها برای انجام تقسیم دوم میبوز روی دوک تقسیم مرتب میشود که بنام متافاز ۲ (Met II) خوانده میشود (توضیح در تجربیات اخیر تمام مراحل PB و جسم قطبی به همراه متافاز ۲ در یک گروه منظور گردیدند).

د: مرحله شکافتگی Cleaved اووسیت بطریقه پارتئوژنز در اثر شکافتگی به سلولهای شبیه پلاستومر تبدیل میگردد.

نتیجه

الف: تاثیر GnRHa در افزایش تعداد فولیکولهای اترتیک

نتیجه بررسی میکروسکپی برشهای ممتد تخمدانی موش رات نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول DES همانطوریکه در جدول شماره ۱ ملاحظه میگردد نمایانگر این است که $1/2 \pm 36/5$ درصد از کل فولیکولهای پیشانترومی شمارش شده تخمدان موش های مورد آزمایش در زمان شروع تزریق (روز چهارم از عمل هیپوفیزکتومی) درجاتی از پیشرفت اترزی را نشان میدهد و تعداد فولیکولهای اترتیک در گروههایی که ۲۴ ساعت قبل از برداشتن تخمدانها سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) و یا هورمون GnRHa دریافت داشته بودند بترتیب به $1/6 \pm 40/1$ و $5/7 \pm 49/5$ درصد از کل فولیکولهای

پیش انترومی تخمدان بالغ گردید . در واقع در تخمدانهای گروه هورمون دریافت داشته افزایشی در حدود ۲۵% در تعداد کل فولیکولهای اترتیک ایجاد شده است .

در بررسی نحوه پخش فولیکولهای اترتیک در ابعاد مختلف فولیکولهای تخمدانی مشاهده میگردد که وسعت اترزی اساساً "بیشتر متوجه فولیکولهای پیش انترومی با ابعاد بزرگتر از ۲۰۰ میکرومتر بوده و هر چه قطر فولیکولی بیشتر میشود درصد وقوع اترزی نیز بالا میرود و این تغییرات در تمام گروههای کنترل و هورمون دریافت داشته مشاهده میگردد . ضمناً "مقایسه میزان پراکندگی اترزی در دو گروه شاهد و هورمون دریافت داشته افزایش درصد بیشتر اترزی را در گروه هورمون دریافت داشته نشان میدهد ، قابل ذکر اینکه پراکندگی اترزی در فولیکولهای با ابعاد کمتر از ۱۰۰ میکرومتر در هر دو گروه شاهد و درمان شده بسیار ناچیز بوده است . و از علائم اترزی همانطوریکه در شکل شماره ۱ مشاهده میگردد در ابتدا بصورت ایست تقسیم میتوزی شکل ۸-۱ و متعاقباً "پراکندگی هسته‌های پیکنوزه در لایه گرانولوزا و بخصوص اطراف اروسیت است اشکال ۱-c, D ،

ب. تاثیر GnRH در فعال نمودن اروسیت موجود در فولیکولهای پیش از انترومی در حال تحلیل .

نتایج بررسیهای میکروسکپی برشهای ممتد تخمدانی حاصل از یک الی سه روز تزریق متوالی هورمون GnRH α و یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) به موشها مورد آزمایش نشان میدهد که هورمون مذکور موجب فعال شدن تعداد قابل ملاحظه‌ای از اروسیت‌های کاملاً " رشد یافته موجود در فولیکولهای پیش انترومی اترتیک میگردد و همانطوریکه در نمودار شماره ۱ محسوس است ۲۴ ساعت بعد از اولین تزریق GnRH α تعداد اروسیت‌های فعال شده بحدود ۴۰% از کل اروسیت‌های تخمدانی بالغ میگردد و ادامه درمان فوق الذکر برای روزهای دوم و سوم و مطالعه تخمدانها بعد از ۲۴ ساعت از آخرین تزریق ایجاد تغییر قابل ملاحظه‌ای در تعداد اروسیت‌های فعال شده نمی‌نماید . ضمناً " در گروه شاهد نیز درصدی از اروسیت‌های موجود در فولیکولهای با اترزی پیشرفته حالت فعال شدن را نشان میدهد که برعکس گروه هورمون دریافت داشته در گروه شاهد باگذشت زمان درصد اروسیت‌های فعال شده بیشتر گردید (خط منقطع از نمودار شماره ۱) نکته قابل توجه اینکه در مطالعه میکروسکپی فولیکولهای پیش انترومی جهت بررسی حالات

اووسیتی روشن گردید که در هیچ موردی از فولیکولهای پیش انترومی سالم (اشکال 1-A و 2-A) و یا حتی فولیکولهای بظاهر سالم در گروه هورمون دریافت داشته (شکل 1-B) فعال شدن اووسیتی مشاهده نگردید و در واقع اثر GnRHa در وادار نمودن اووسیت به از سرگیری تقسیم میوزی محدود به فولیکولهای اترتیک میباشد (اشکال C و D - 1)

ج: بررسی میانگین درصد اووسیت‌های فعال شده در ابعاد مختلف فولیکولی:

نمودار شماره ۲ نمایانگر درصد اووسیت‌های فعال شده در فولیکولهای پیش انترومی اترتیک تخمدانی نسبت به کل همان ابعاد از فولیکول میباشد. همانطوریکه ملاحظه میگردد فولیکولهای با ابعاد کمتر از ۱۰۰ میکرومتر در هر دو گروه شاهد و هورمون دریافت داشته کلاً " غیر حساس بودند در حالیکه در فولیکولهای با ابعاد ۲۰۰-۱۰۰ میکرومتر از گروه هورمون دریافت داشته ۲۲/۵٪ از کل فولیکولهای همین گروه دارای اووسیت فعال شده بودند ولی اکثریت اووسیت‌های فعال شده گروه فوق‌الذکر متعلق به دسته فولیکولهای با ابعاد ۲۰۰-۳۰۰ و ۳۰۰-۴۰۰ میکرومتر میباشد که بترتیب دارای ۶۰٪ و ۵۶٪ اووسیت فعال شده نسبت به کل اووسیت موجود در فولیکولهای با ابعاد متعلق به گروه خود بودند.

د: بررسی پیشرفت تدریجی مراحل مختلف تقسیم میوزی اووسیت و ایجاد سلولهای شبیه بلاستومر

دریک‌الی سه‌روز بعد از تزریق GnRHa

نمودار شماره ۳ و شکل شماره ۲ نشان‌دهنده مراحل مختلف پیشرفت تقسیمات میوزی در گروه موشهای مورد آزمایش متعاقب یک الی سه روز از تزریق منفرد ۱۰۰ میکروگرمی GnRHa میباشد.

همانطوریکه در نمودار فوق‌الذکر مشاهده میگردد ۲۴ ساعت بعد از تزریق هورمون (روز پنجم از عمل هیپوفیزکتومی) ۲/۵⁺ ۶۷/۷ درصد از مجموع اووسیت‌های مورد مطالعه از حالت دیکتیوتن (GV) اشکال A-1 و A-2 خارج شده و وارد مرحله متافاز از تقسیم اول میوز گردیدند (GVBD) یعنی مرحله‌ای که هستک و غشاء هسته ناپدید شده و کروموزومها متراکم گشته‌اند (ستون سفید رنگ از نمودار ۳ و شکل B-2) و در مقابل ۶-۲۳/۹ درصد از اووسیت‌های فعال شده در همین زمان اولین گویچه قطبی را از خود

خارج نموده و یا حتی وارد مرحله متافاز ۲ گشته‌اند (ستون سیاه از نمودار فوق‌الذکر و اشکال D و E) و تنها $3/2 \pm 8/8$ درصد از کل اووسیت‌های فعال شده در مرحله شکافتگی و ایجاد سلول‌های شبیه پلاستومری بودند (ستون مشبک از نمودار ۳ و اشکال E و F - ۲) و حال آنکه ۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون درصد اووسیت‌های فعال شده به ترتیب در مرحله GVBD $3/8 \pm 23/7$ و PB و متافاز II $6/7 \pm 20/3$ و تعداد سلول‌های شبیه پلاستومر به $8/7 \pm 56/1$ درصد تغییر یافت و بهمین ترتیب ۷۲ ساعت از تزریق GnRH درصد اووسیت‌های فعال شده در مرحله GVBD $6 \pm 17/2$ و متافاز II $3/8 \pm 8$ کاهش یافت ولی برعکس میانگین تعداد سلول‌های شبیه پلاستومر $11 \pm 74/8$ از کل تخمک‌های فعال شده را شامل گردیدند.

بحث

در تجربیات اخیر برای مطالعه اثر مستقیم GnRH در ایجاد تغییرات ساختمانی فولیکول‌های تخمدانی از موش رات ماده نابالغ هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول DES استفاده گردید نظر باینکه سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های اولیه تخمدان با تکرار عمل تقسیمات میتوزی خود موجب رشد فولیکول میگردند (۳۱، ۶۳) و عمل هیپوفیزکتومی در عرض ۲۴ ساعت فعالیت تقسیم میتوزی را در بین سلول‌های فوق‌الذکر کاهش داده و در نتیجه فولیکول‌های تخمدانی دچار اترزی میگردند (۷۵) لذا کاشتن کپسول حاوی دی‌اتیل استیل بسترول (DES) در موش‌های هیپوفیزکتومی شده جهت رشد یکدست فولیکول‌های تخمدانی تا مرحله پیش‌انترومی ضروری مییابد زیرا رشد فولیکول‌ها تا مرحله فوق‌الذکر مستقل از تاثیر هورمون FSH بوده و تنها تحت نفوذ فاکتورهای درون تخمدانی از جمله استروژن قرار دارد (۲، ۳) بطوریکه تجربه نشان داده است برداشتن کپسول حاوی DES موجب توقف تقسیم میتوزی در لایه گرانولوزا و گسترش شدید اترزی در فولیکول‌های تخمدانی می‌گردد (۶، ۷۶). باید توجه داشت که با شروع بلوغ جنسی زمانیکه تعدادی از فولیکول‌های مقدماتی تخمدانی برای رشد انتخاب میگردند، سرنوشت نهائی آنها یا تبدیل شدن به فولیکول‌های اختصاص یافته برای تخمک گذاری است و یا اینکه طی مرحله‌ای بنام اترزی دژنره گشته و از بین میروند (۴۵) و حال آنکه رشد محدود فولیکول‌ها در قبل از شروع فعالیت جنسی تماماً "منجربه اترزی می‌گردد". بهمین علت در حالت طبیعی میزان اترزی

در تخمدان حیوانات نابالغ بمراتب بیشتر از زمان بلوغ است (۶۴، ۱۱، ۱۵) لازم بتوضیح است که در مطالعه میکروسکوپی تخمدان بعضاً "تمایز بین فولیکولهای سالم و اترتیک از یکدیگر دشوار میباشد و اغلب معتقدند که فولیکولهای سالم تخمدانی میباشد تهی از هسته‌های پیکنوزه در لایه گرانولوزا بوده و تقسیمات میتوزی فراوان داشته باشند و در مقابل از خصوصیات فولیکولهای اترتیک کاهش فعالیت تقسیم میتوزی با افزایش هسته‌های پیکنوزه و نیز افزایش فعالیت آنزیمی اسید فسفاتاز اسید میباشد (۳۲) ولی در مطالعات اخیر همانند گزارشات قبلی (۷۳، ۷۲) اساس تعیین فولیکولهای اترتیک با شمارش تعداد بیش از ده هسته پیکنوزه در لایه گرانولوزای بزرگترین مقطع از فولیکول مد نظر قرار گرفت. همانطوریکه در جدول شماره ۱ آمده است علی‌رغم کار گذاشتن کیپول حاوی DES، در زمان شروع آزمایش که مصادف با روز چهارم از عمل برداشتن هیپوفیز بود $1/2 \pm 36/5$ درصد از کل فولیکولهای پیش انترومی تخمدانهای مورد مطالعه اترتیک بودند و موقعیکه GnRH α به حیوانات مورد آزمایش تزریق گردید درصد فولیکولهای در حال تحلیل بعد از ۲۴ ساعت از ورود هورمون در مقایسه با گروه شاهد افزایش در حدود ۲۵ درصد را نشان میدهد و تاثیر مذکور در فولیکولهای با ابعاد بزرگتر بیشتر محسوس است. بررسی نتایج فوق نشان میدهد که اولاً "اترزی گسترده‌ای در تخمدان مدل موش راست مورد آزمایش وجود دارد (۷۲) و در ثانی اثر اولیه GnRH α در ایجاد تغییرات ساختمانی فولیکولهای تخمدانی میتواند همان افزایش درصد اترزی در تخمدان باشد و این تائیدی است برگزارش قبلی که هورمون مذکور موجب کاهش فعالیت تقسیمات میتوزی در لایه گرانولوزا میگردد (۷۳) و مهار تقسیم سلولی خود عامل توقف رشد فولیکول میباشد (۸۶) ضمناً "نوع اترزی در دو گروه شاهد و هورمون دریافت داشته از نظر تغییرات مورفولوژیکی فولیکول متفاوت میباشد بطوریکه در گروه شاهد، توده کومولوسی آخرین قسمت از فولیکول است که دچار اترزی میگردد، در حالیکه گروه GnRH α دریافت داشته اولین علائم اترزی در توده کومولوسی ظاهر میشود که از جمله آن همانطوریکه در تصاویر ۱ و ۲ مشهود است میتوان قطع ارتباط اووسیت با سلولهای فولیکولی اطرفی و گسیختگی ارتباط بین سلولی توام با گسترش هسته‌های پیکنوزه را نام برد که خود همراه با فعال شدن اووسیتها در تعداد قابل ملاحظه‌ای از فولیکولهای پیش انترومی میباشد (نمودار شماره ۱) و این موید گزارشات متعددی است که تاکنون در این رابطه انتشار یافته

است (۳۹، ۲۹، ۲۸، ۲۳، ۴) ضمناً " ادامه بررسی میکروسکوپی اثر GnRH_a بر روی اووسیت‌های فعال شده بمدت ۱-۳ روز از تزریق هورمون همانطوریکه در نمودار شماره ۳ مشهود است نشانگر سیر طبیعی پیشرفت مراحل تقسیم رسیدگی اووسیت و متعاقباً " فعال شدن پارتنوژنیکی آنها در ایجاد سلول‌هایی شبیه بلاستومر است و این موید گزارشی است که GnRH_a موجب از سرگیری میبوز، کلیواژ و تشکیل سلول‌های مشابه بلاستومر میگردد (۲۹) باید توجه داشت که اووسیت پستانداران معمولاً " در زمان تولد و یا مدت کوتاهی قبل از آن در مرحله دیکتیوتن (GV) از پروفاز تقسیم اول میبوز قرار داشته و تنها بعد از تاثیر گونادوتروپین‌ها و چند ساعت قبل از آماده‌سازی فولیکول برای تخمک‌گذاری، اووسیت موجود در آن دوباره فعال میگردد (۱۴) و در حالت عادی علیرغم این‌که اووسیت موجود در فولیکول‌ها پیش انترومی بحد اکثر رشد حجمی خود دست یافته و شایستگی لازم را برای از سرگیری تقسیم میبوزی کسب نموده است (۵) ولی توسط عوامل مهارکننده در مرحله دیکتیوتن باقی میماند (۸۳) و این تائیدی است بر یافته‌های اخیر که در نمودار شماره ۲ ارائه گردید و نشان دهنده تاثیر GnRH_a در فعال ساختن اغلب اووسیت‌های موجود در فولیکول‌های با ابعاد بزرگتر از ۲۰۰ میکرومتر است یعنی فولیکول‌هایی که حاوی اووسیت کاملاً " رشد یافته هستند ولی برعکس همانطوریکه در نمودار فوق مشهود است فولیکول‌هایی که کوچکتر از ۱۰۰ میکرومتر قطر میباشند بعلت عدم رشد کافی اووسیت بی تاثیر باقی مانده‌اند. بنابراین با توجه به داده‌های فوق میتوان بیان نمود که ظرفیت از سرگیری میبوز در مرحله خاصی از رشد و تمایز اووسیت حاصل میگردد (۷۷) بطوریکه اگر اووسیت کاملاً " رشد کرده را از فولیکول‌های با ابعاد متوسط و بزرگ جدا نموده و در محیط کشت مناسب قرار دهند اووسیت‌های فعال میگردند در حالیکه همین اووسیت‌ها در تخمدان موجود زنده *In Vivo* در مرحله دیکتیوتن قرار داشتند (۲۷، ۱۳) در مورد وجود مواد مهارکننده فعالیت میبوز، اووسیت که باختصار OMI نامیده میشود نشان داده شده است که افزودن مایع فولیکولی به محیط کشت حاوی اووسیت‌های به‌مراه توده کومولوسی‌خوک (۱۲، ۵۳، ۷۸، ۶۸، ۸۰، ۸۱) و موش رات (۶۷، ۸۲) و هامستر (۳۳) موجب ممانعت از فعال شدن اووسیت گشته که خود میتواند مطرح‌کننده وجود مواد مهاری فوق الذکر در مایع فولیکولی باشد. اخیراً " از مایع فولیکولی موادی مثل هیپوگزان‌تین و ادنوزین جدا نموده‌اند (۲۲) لازم بتوضیح است که ادنوزین میتواند فعالیت آنزیم

ادنیل سیکلاز را تحریک نموده و یا خود به ATP متابولیزه گشته و سپس به آدنوزین منوفسفات حلقوی (CAMP) تبدیل گردد و هیپوگزانتین نیز دارای اثر مهارى فعالیت آنزیمی فسفودی استراز که تخریب کننده CAMP است میباشد. بنابراین دو ماده فوق الذکر با یکدیگر دارای یکنوع حالت سینرژیسم مثبت بوده و قادرند اووسیت موجود در توده کومولوسی و حتی اووسیت جدا شده از توده فوق الذکر را در محیط کشت برای مدتی در مرحله GV نگهدارد (۲۱،۱۹) با توجه به تجربیات فوق الذکر میتوان نتیجه گرفت که وجود توده کومولوسی سالم جهت تاثیر OMI لازم و ضروری میباشد (۱۳) بطوریکه توده کومولوسی در هر دو حالت ابقاء اووسیت در مرحله دیکتیوتن و یا از سرگیری میبوز نقش مهمی را میتواند داشته باشد و برداشتن توده کومولوسی از اطراف اووسیت در هامستر (۳۳) و در موش را (۱۹) موجب از سرگیری میبوز در محیط کشت میگردد. معمولا "در حالت عادى موقعی که فولیکول تخمدانی دچار اترزی پیشرفته میگردد بعضا اووسیت آن نیز تقسیم رسیدگی زودرس خود را شروع میکند (۴۰) و این موید گزارش اخیر است که تشدید اترزی ناشی از تاثیر GnRHa همراه با فعال شدن تعداد قابل ملاحظه‌ای (۴۰٪) از اووسیتها میباشد. و از آنجائیکه سلولهای گرانولوزا مسئول تولید OMI هستند (۸۳) کاهش تولید OMI میتواند عامل فعال کننده اووسیت به از سرگیری میبوز باشد. ضمناً "گزارشات نشان میدهد که OMI نفوذ مهارى از خود را از طریق سلولهای تاج شعاعی اطراف اووسیت اعمال نموده و در ایجاد پلهای بین سلولی نیز موثر میباشد (۸۳) پلهای بین سلولی مذکور معمولا "در مراحل اولیه از رشد فولیکولی ظاهر میگردد (۹) و این ارتباط در تمام طول دوره رشد فولیکولی باقی میماند (۱) و معتقدند که اتصالیهای فوق الذکر که از نوع سوراخ دار (J-G) میباشد بصورت کانالی برای انتقال مولکولهای کوچک بین سلولی فعالیت دارند (۵۵) که این پدیده را ارتباط متابولیکی و یا همکاری متابولیکی نیز مینامند (۶۶،۶۵) و مطالعات متعدد نشان داده است که متابولیتهای سلولی از سلولهای توده کومولوسی و از طریق اتصالیهای مذکور به اووسیت منتقل میگردد (۶۱،۳۷،۲۴) و در حقیقت رشد اووسیت بمقدار زیادی وابسته به انتقال مواد متابولیکی از سلولهای گرانولوزا بان میباشد بطوریکه برآورد گردیده تا ۸۵٪ مواد متابولیکی موجود در اووسیت از طریق ارتباط بین سلولی مذکور کسب میگردد (۳۸،۸) ضمناً " نشان داده شده است که دوام همکاری متابولیکی مذکور در طی رسیدگی میبوز

کاهش مییابد (۶۲،۲۵،۲۵) یعنی در این موقع بعلت انقباض میکروویلیهای متعلق به سلول های تاج شعاعی ارتباط سلولهای فوق الذکر از غشاء اووسیتی قطع میگردد (۳۵) و با توجه به نتایج حاصل از آنجائیکه تاثیر اولیه GnRH_a در ساختمان فولیکولها بهم زدن ساختمان یکدست توده کومولوسی و ایجاد گسیختگی در پلهای بین سلولی و نیز با سطح اووسیت است احتمالاً " درانتقال مواد مهار کننده تقسیم میوزی بداخل اووسیت اختلال ایجاد نموده و بعلت قطع انتقال CAMP و هیپوگزانتین بداخل اووسیت و نیز تخریب CAMP موجود در اووسیت بعلت افزایش فعالیت آنزیم فسفودی استراز، اووسیت (۴۷) سطح داخل اووسیتی CAMP پائین آمده و اووسیت شروع به از سرگیری میوز می نماید (۲۷،۲۶) .

نتیجه کلی:

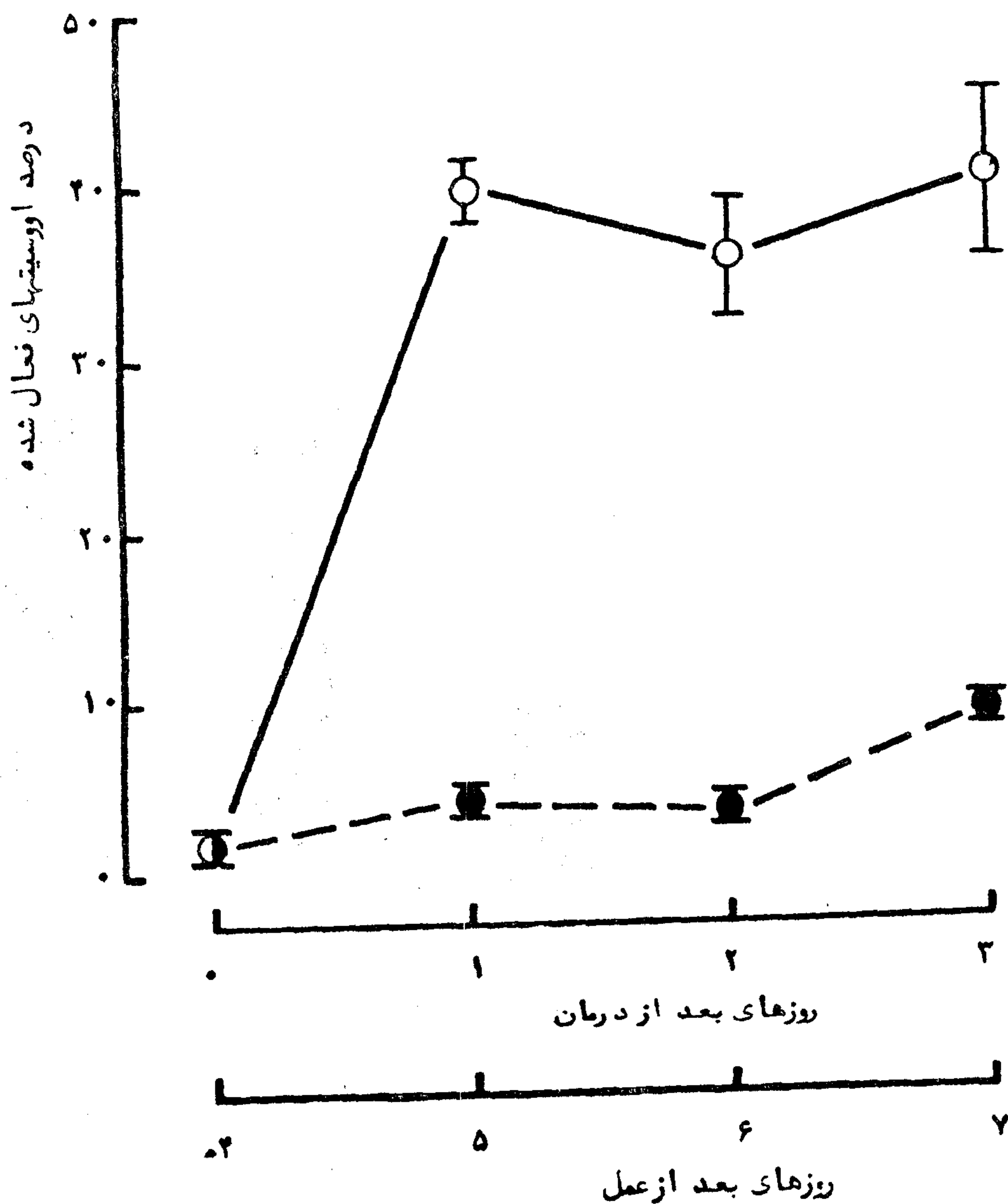
اولاً: اترزی گسترده ای در تخمدان مدل موش رات هیپوفیزکتومی شده حاوی کپسول DES وجود دارد .
 ثانیاً: یکی از اثرات اولیه انالوگ GnRH در تخمدان مدل حیوانی مذکور میتواند گسترش اترزی در اجتماع فولیکولهای پیش انترومی باشد .
 ثالثاً: متعاقب تاثیر GnRH_a در توده کومولوسی و ایجاد قطع ارتباط بین اووسیت و سلولهای تاج شعاعی تعداد قابل ملاحظه ای از اووسیت های موجود در فولیکولهای پیش انترومی اترتیک، تقسیم میوزی خود را از سر میگیرند .

تشکر:

بدینوسیله از آقایان بهروز فتحی و عماد چنگیزی که بترتیب در تهیه نمودارها و تصاویر با اینجانب همکاری نموده اند و به خصوص خانم کناریکیت گر که در تایپ مقاله زحمات زیادی را متحمل شده اند صمیمانه تشکر و قدردانی مینماید .

جدول شماره ۱- نشان دهنده تعداد کل فولیکولهای اترتیک در گروه موشهای مورد آزمایش در زمان شروع و ۲۴ ساعت بعد از تزریق GnRHa و پارسوم فیزبولوی (گروه کنترل) میباشد و نیز درصد فولیکولهای اترتیک را در ابعاد مختلف فولیکولی مشخص میسازد

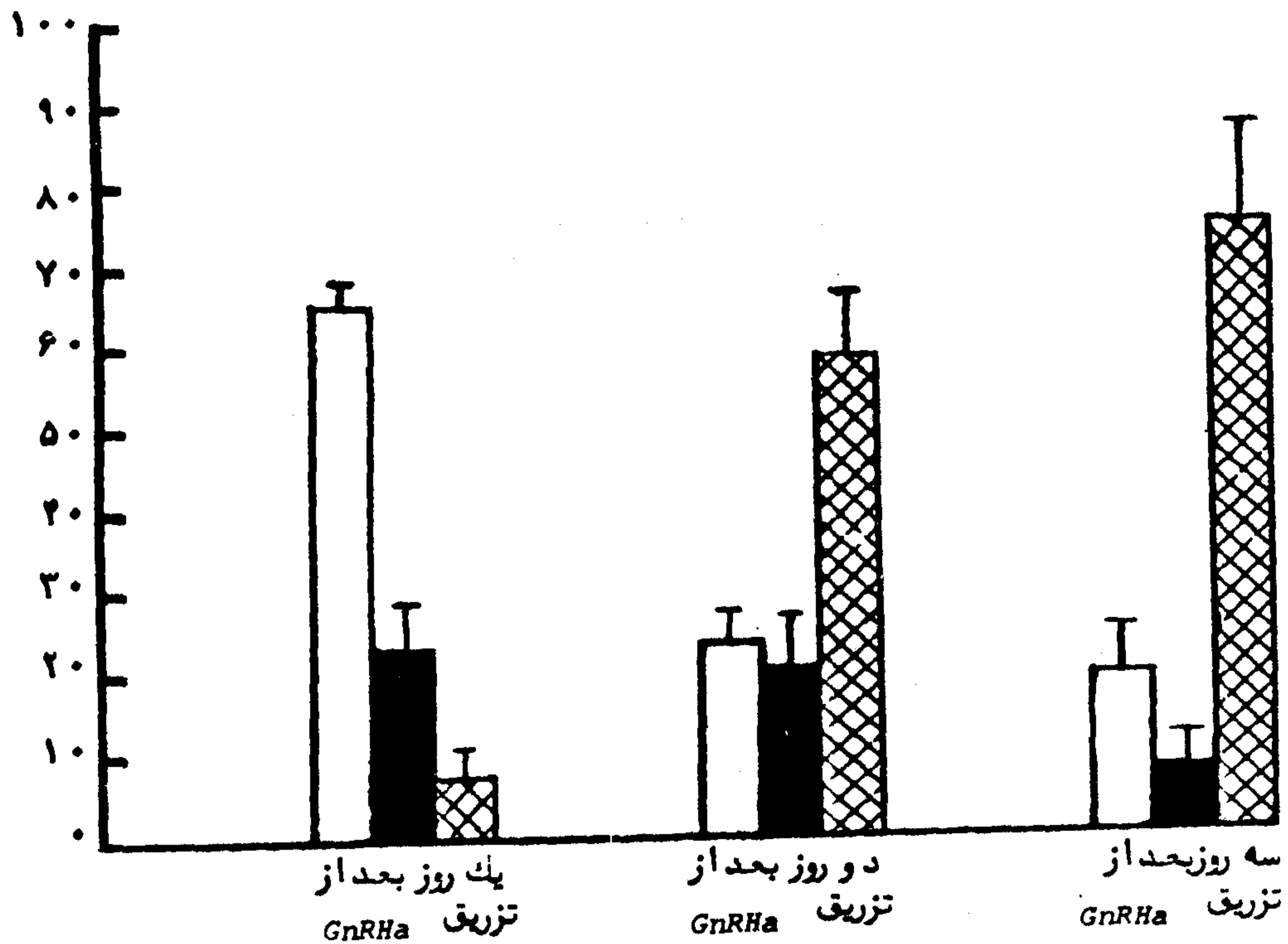
زمان انجام آزمایش	فولیکولهای اترتیک در تخمدانها Mean SEM	% اترزی در ابعاد مختلف فولیکولهای تخمدانی Mean SEM			
		۱۰۰ میکرومتر	۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر	۲۰۰-۳۰۰ میکرومتر	۳۰۰-۴۰۰ میکرومتر
روز شروع آزمایش (۴ روز بعد از عمل) بدون تزریق	۳۶/۵ ± ۱/۲	۰ (صفر)	۱۲/۱ ± ۴/۲	۵۶/۳ ± ۳/۹	۵۴/۵ ± ۴/۳
۲۴ ساعت بعد از تزریق سرم فیزبولوی (گروه شاهد)	۴۰/۱ ± ۰/۵	۴/۴ ± ۱/۴	۲۴/۴ ± ۸/۲	۵۵/۶ ± ۳/۳	۵۹/۲ ± ۶/۲
۲۴ ساعت بعد از تزریق GnRHa	۴۹/۵ ± ۰/۷	۱۱/۸ ± ۱/۳	۳۳/۳ ± ۴/۲	۶۴/۱ ± ۱/۳	۸۳/۷ ± ۲/۵



نمودار شماره ۱- نشان دهنده میانگین درصد اووسیت‌های فعال شده در تخمدان موش‌های رات گروه کنترل و GnRHa دریافت داشته در روزهای ۴-۷ بعد از عمل هیپوفیزکتومی می‌باشد.

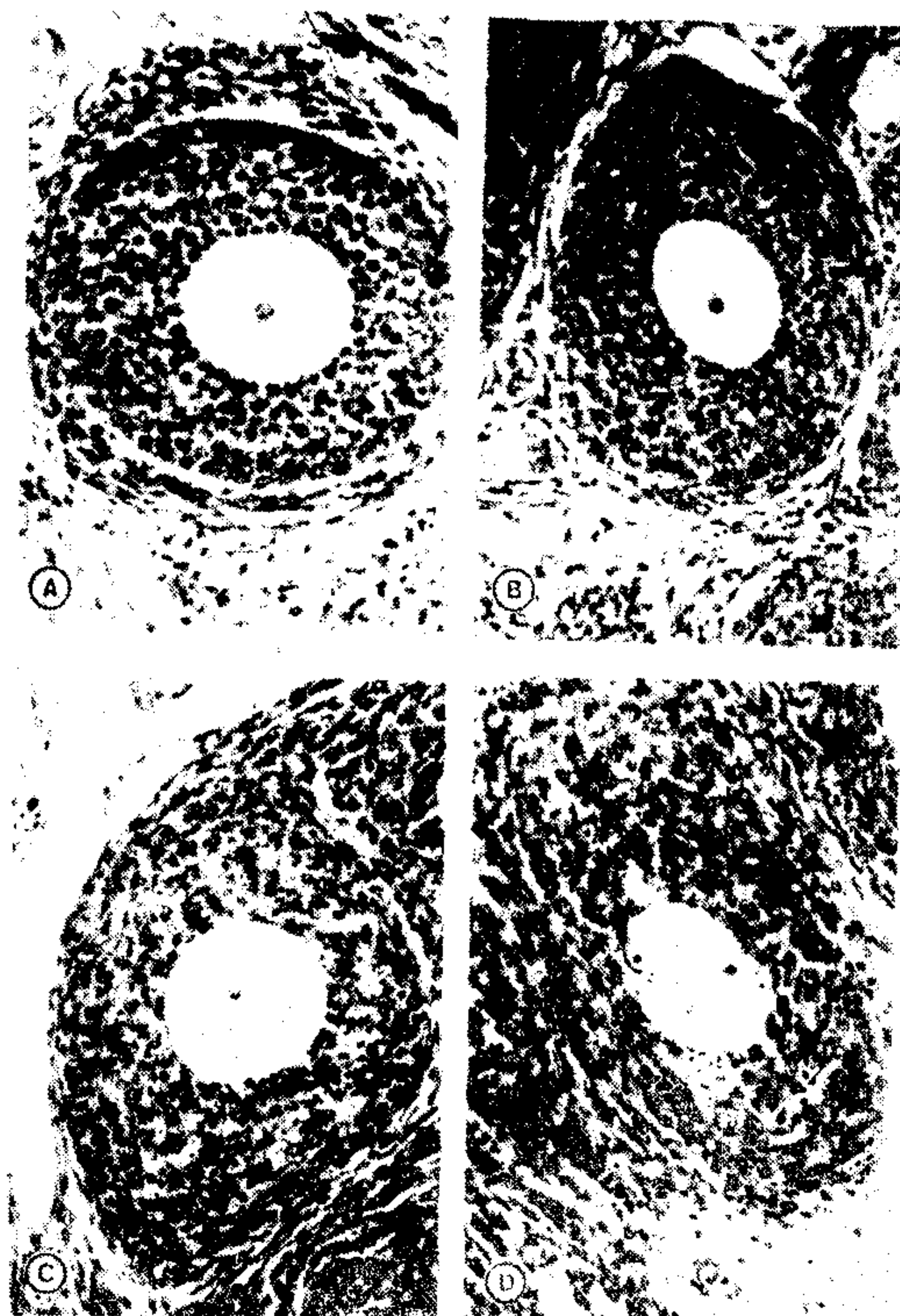
گروه شاهد، O---O، گروه هورمون دریافت داشته.

نتایج هرگروه از بررسی میکروسکوپی اووسیت‌های فعال شده موجود در $SEM \pm 3-4$ تخمدان حاصل گردیده است در گروه شاهد درصد اووسیت‌های فعال شده در روزهای ۴-۷ بعد از عمل برداشتن هیپوفیز ۲-۹ درصد در تمامی فولیکول‌های مورد مطالعه است ولی گروه GnRHa دریافت داشته یکروز بعد از تزریق درصد اووسیت‌های فعال شده به ۴۰٪ بالغ گردید و در روز دوم و سوم از درمان GnRHa سطح اووسیت‌های فعال شده بدون تغییر باقی مانده است.



نمودار شماره ۳- درصد اووسیت‌های فعال شده در مراحل GVBD و PB و پوسا شکافتگی را بعد از ۳-۱ روز از تزریق GnRHa نشان می‌دهد. هر یک از ستونها نمایانگر میانگین SEM ۳-۴ تخمدان می‌باشد.

اووسیت‌های فعال شده در مرحله GVBD اووسیت‌های فعال شده حاوی جسم قطبی (PB) شکافتگی تخم و ایجاد سلول‌های شبیه بلاستومر



تصویر شماره ۱

فولیکولهای پیش انترومی تخمدان درحالات سالم و اترتیک با اووسیت‌های در مرحله دیکتیوتن و یا فعال شده .

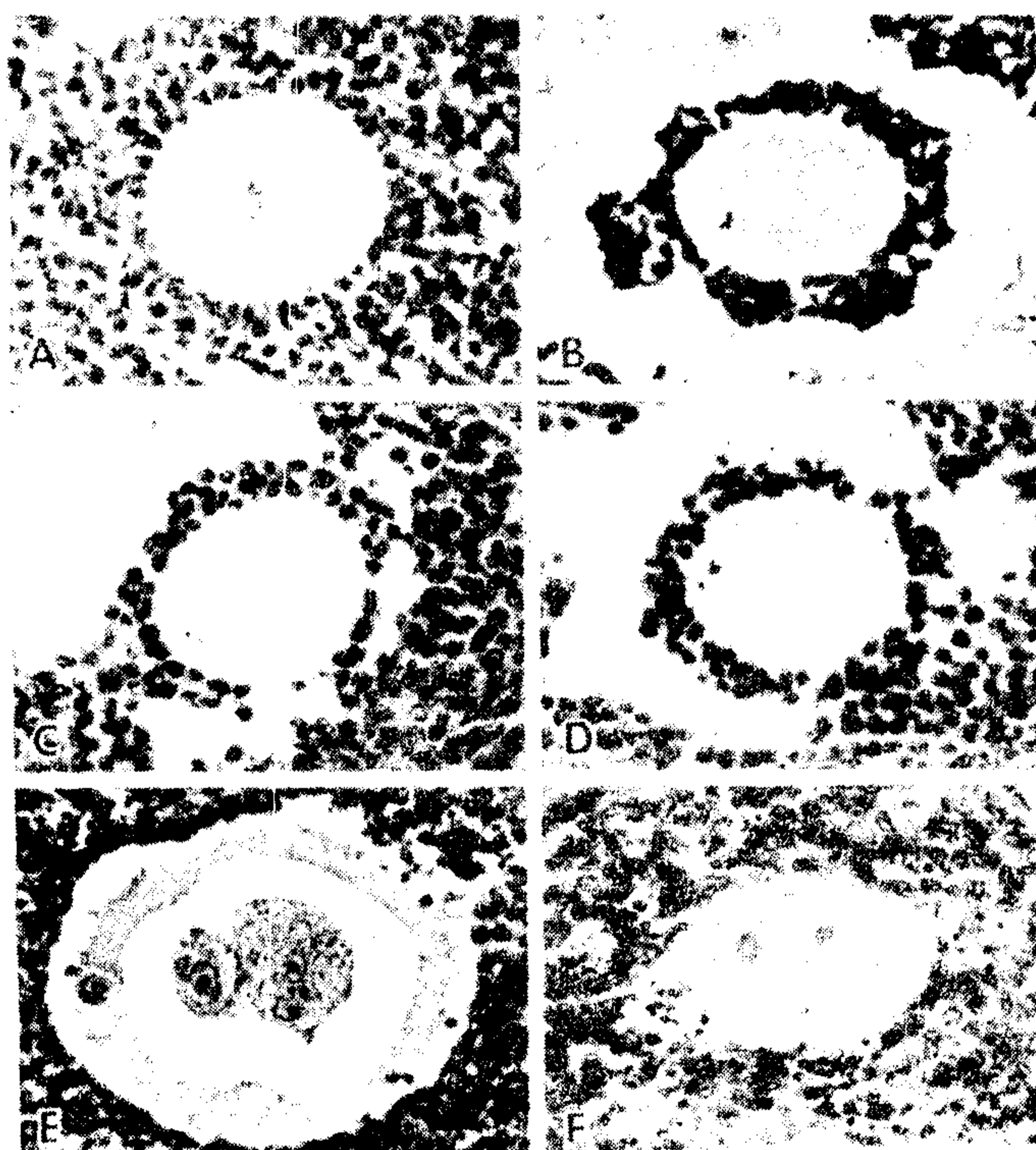
A : فولیکول کاملاً " سالم متعلق به گروه شاهد یا اووسیت رشد کرده در مرحله GV بتعداد تقسیمات میتوزی در لایه گرانولوزا توجه شود .

B : فولیکول بظاهر سالم متعلق به گروه GnRHa دریافتی داشته یا اووسیت تقریباً " رشد کرده مرحله GV در لایه گرانولوزا ، اثری از تقسیم میتوزی مشاهده نمی‌شود .

C : فولیکول اترتیک با تعداد کثیری هسته‌های پیکنوزه و هسته‌ای در مرحله

D : فولیکول اترتیک با تعداد کثیری هسته‌های پیکنوزه و دوسلول شبیه بلاستومر

در مرکز فولیکول رنگ آمیزی هماتوکسیلین + ائوزین $240 \times$



تصویر شماره ۲

مراحل پیشرفت تدریجی از فعال شدن اووسیت در فولیکولهای پیش انترومی موش بالغ نابالغ هیپوفیز کتومی شده حاوی کپسول DES را در اثر تزریق GnRH_a نشان میدهد

A : اووسیت در مرحله دیکتیوتن (GV) میباشد که کاملاً " رشد کرده غشاء هسته و هستک کاملاً " مشهود است .

B : اووسیت فعال شده در مرحله شروع متافاز GVBD که غشاء هسته و هستک ناپدید گردیده و کروموزومها متراکم شده اند .

C : اووسیت به همراه جسم قطبی (PB) است که متعاقب پایان تقسیم اول میبوز حاصل میگردد .

D : اووسیت در مرحله متافاز (Met II) به همراه جسم قطبی کروموزومها بار دیگر در گوشه‌ای از سیتوپلاسم سلول متراکم میگرددند .

E : تسهیم باشکافتگی تخم در مرحله دوبلاستومری

F : مرولا با توده سلولی مشابه بلاستومر که معمولاً " از روز سوم بعد از تزریق ظاهر میگرددند .

رنگ آمیزی هماتوکسیلین + ائوزین ۲۸۸×

GnRH = Gonadotropin-releasing hormone.

OMI = Oocyte maturation inhibitor.

CAMP = Cyclic adenosine 3-5monophosphate.

DES = Diethylstilbestrol.

GJ = Gap junction.

GV = Germinal Vesicle.

GVBD = Germinal vesicle breakdown.

Met II = Metaphase II.

PB = Polar body.

PRL = Prolactin.

FSH = Follicle-Stimulating hormone.

LH = Luteinizing hormone.

مقاله ارائه شده قسمتی از کارهای تحقیقاتی نویسنده در طی دوره فرصت مطالعاتی در مرکز تحقیقات تولید مثل دانشکده پزشکی دانشگاه سان دیاگو کالیفرنیا میباشد.

References

- 1- Anderson, E. Albertini, D.F. 1976, Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian Ovary. *J Cell Biol* 77:680-686.
- 2- Armstrong, D.T. and Papkoff, H. 1976. Stimulation of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 99, 1144-1151.
- 3- Armstrong, D.T. Goff, A.K. and Dorrington, J.H. 1979. Regulation of follicular estrogen biosynthesis In *Ovarian follicular development and function* (A.R. Midgley and W.A. Sadler Eds) Raven Press, New York, PP169-181.
- 4- Banka, C.L. Erickson, G.F. 1985. Gonadotropin-releasing hormone induces Classical meiotic maturation in subpopulations of Preantral follicles. *Endocrinology*. 117; 1500-1507
- 5- Bar-Ami, S. Tsafiriri, A. 1981 Acquisition of meiotic competence in the rat.: role of gonadotropin and estrogen. *Gamete Res.* 4:463-472.
- 6- Bicsak, T.A. Cajander, S.B. Peng, X.R. Tory, N.Y. Lapolt, P.S. Kristensen, K.H. Tsafiriri, A. and Hsueh, A.J.W. 1989. Tissue-type plasminogen activator in rat oocyte; Expression during the periovulatory period, after fertilization and during follicular atresia. *Endocrinology*. 124:187-194.
- 7- Borgus, R. Butcher, M. Amoss, M. Ling, N. Monahan, M. Rivier, J. Fellows, R. Blackwell, R. Vale, W. Guilleman, R. 1971 Molecular structure of the hypothalamic factor (LRF) of ovine origin Controlling secretion of hypophysial luteinizing hormone. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 273: 1611- 1613.

-
- 8- Brower,PT.Schultz, RM.1982. Intercellular Communication between granulosa Cells and mouse oocytes:Existence and possible nutritional role during oocyte growth. Develop. Biol. 90: 144-153.
 - 9- Burghardt,RC. and Matheson,RL. 1982. Gap junction amplification in rat ovarian granulosa cells. Develop. Biol. 94:206-215.
 - 10- Byskov,AG. 1978.Follicular atresia.In:The Vertebrate. ovary,Jones,RE(Ed) Plenum Press New York pp 533-562.
 - 11- Byskov,AG. 1979 Atresia.In:Ovarian follicular development and function.Midgley,AR. and Sadler,WA eds.Raven Press.New York _P 41-57.
 - 12- Centola, GM.Anderson,LD.and Channing,CP. 1981 Oocyte maturing inhibitor(OMI) activity in porcine granulosa cells,Gamete Research. 4:451-462.
 - 13- Channing,CP.Schaerf, FW. Anderson, LD.and Tsafriri,A. 1980 Ovarian follicular and luteal physiology.In: Reproductive physiology.III.International review of physiology,Vol,22: R.O.Greep.Ed.117-201.
 - 14- Channing,CP. Pomerantz,SH. Bae,IH.Evans, VW, and Atlas, ST. 1982. Actions of hormone and other factors upon oocyte maturation : In :Advances in experimental medicine and biology. Vol.147.Edited by Channing,CP. and Segal.SJ.PlenumPress ,New York 189- 208.
 - 15- Cloek, MR.Thibier,C.Marsh,JM. Lemaire,WJ,1980. Stimulation of Prostaglandin accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells in vitro.Endocrinology.107:17 -23.

-
- 16- Clyton, RN. Harwood, JP. Catt, KJ. 1979. Gonadotropin - releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. Nature. 282: 90-92.
- 17- Corbin, A. and Beattie, CW. 1975 Inhibition of the preovulatory proestrous gonadotropin surge ovulation and pregnancy with a peptide analogue of LHRH. Endocrinology Res. Commun. 2 1-24
- 18- Corbin, A. and Bex, FJ 1981. Luteinizing hormone releasing hormone agonists induce ovulation in hypophysectomized proestrous rats. Direct ovarian effect. Life Sci, 29: 185-192.
- 19- Dekel, N. Beers, WH. 1980 Development of the rat oocyte in Vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. Develop. Biol. 75: 247-254.
- 20- Dekel, N. Lawrence, TS. Gilula, NB. Beers, WH. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte maturation by LH. Develop. Biol. 86: 356-362.
- 21- Downs, SM. and Eppig, JJ. 1984 Cyclic adenosine monophosphate and Ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. Endocrinology. 114: 418-427.
- 22- Downs, SM, Coreman, DL. Ward-Bailey, JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular portion of porcine follicular fluid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82. 454-458,
- 23- Eckholm, C. Hillensjo, T. Isaksson, O. 1981. Gonadotropin-releasing hormone agonist stimulates oocyte

-
- meiosis and ovulation in hypophysectomized rats.
Endocrinology 108: 2022-2024.
- 24- Eppig, JJ. 1982. The relation between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Develop. Biol.* 89: 268-272.
- 25- Eppig, JJ. and Ward-Bailey, P. 1982. The mechanism of cumulus cell-oocyte uncoupling: evidence for the participation of both cumulus cells and oocyte. *Gamete. Res.* 6: 145-154.
- 26- Eppig, JJ. Freter, RR. Ward-Bailey, P. Schultz, RM. 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of CAMP, Steroid hormones, and a putative maturation inhibitory factor. *Develop. Biol.* 100: 39-49
- 27- Eppig, JJ. 1986. Mechanism controlling mammalian oocyte maturation. *Research in reproduction. Vol 18: PP 1-2.*
- 28- Erickson, GF. and Hsueh, AJW. 1980 GnRH induces abnormal oocyte maturation in hypophysectomized rats. Program of the 27th annual meeting of the society for gynecologic investigation. Denver, Co (Abstract 316).
- 29- Erickson, GF. Hofeditz, C. Hsueh, AJW. 1983. GnRH stimulates meiotic maturation in Preantral follicles of hypophysectomized rats. In factors regulating ovarian function. (Greenwald; GS. Terranova, PF, Eds) Raven Press, New York, pp 257-261.
- 30- Gilula, NB. Epstein, ML. Beers, WH. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation: A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell. Biol.* 78: 58-75.

- 31- Goldenbenberg, RL. Vaitukaitis, JL, and Ross, TG. 1972. Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90; 1492-1498.
- 32- Greenwald, GS. 1974. Role of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in follicular development and ovulation. In: *Handbook of physiology sect. 7: Endocrinology*, edited by S.R. Geiger, Waverly press, Baltimore. pp 293-323'
- 33- Gwatkin, RBL. and Andersen, OF. 1976. Hamster oocyte maturation in vitro inhibition by follicular components, *Life Sciences*, 19: 527-536.
- 34- Harris, GW. 1955 Neural control of the pituitary gland. Arnold, London pp.
- 35- Harwood, JP, Cloyton, RN. Chin, TT. Knox, G. Catt, KJ. 1980. ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. *Endocrinology* 107 : 414- 421.
- 36- Herber, D. Marshall, JC. Odell, WD. 1978. GnRH membrane binding: Identification, specificity, and quantification in nonpituitary tissues. *Am. J. Physiol.* 235-E227.
- 37- Heller, DT. Schultz. RM. 1980 Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between the freely grown oocyte and cumulus cells. *J. Exp. zool.* 214: 355-364.
- 38- Heller, DT. Cahill, DM, Schultz, RM. 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Develop. Biol.* 84: 455-464.

-
- 39- Hillensjo, T. and Lemaire, WJ. 1980 . Gonadotropin releasing hormone agonist stimulate meiotic maturation in follicle-enclosed rat oocytes in vitro. Nature. 287:145-146.
- 40- Hirshfield, AN. and midgley, AR. 1978 Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol, Reprob. 19:597-605.
- 41- Hsueh, AJW. and Erickson, GF. 1979 Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone. Direct inhibition of ovarian steroidogenesis. Science. 204: 854-855.
- 42- Hsueh, AJW. and Ling, NC. 1979. Effect of an atagonistic analog of gonadotropin releasing hormone upon ovarian granulosa cell function. Life Science. 25: 1223-1229
- 43- Hsueh, AJW. Wang, C. and Erickson, GF. 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.
- 44- Hsueh, AJW. Liu, XY. Cajander, S. Peng, XR. Dahl, K. Kristensen, P. Ny. T. 1988. Gonadotropin releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: studies on ovarian tissue type plasminogen activator activity, ribonucleic content and cellular localization. Endocrinology. 122:1486-

-
- 45- Ingram. DL. 1962. Atresia. In : The ovary, Vol.1
Edited by S, Zuckerman. AM.Mandle, and P. Eckstein,
Academic press, New York pp. 247-275.
- 46- Jones, PBC.Conn.PM.Marian, J. and Hsueh Hsueh, AJW. 1980
Binding of gonadotropin-releasing hormone agonist to
rat ovarian granulosa cells. Life Science. 27 : 2125-2132
- 47- Jones, PBC. and Hsueh, AJW. 1981. Direct stimulation
of ovarian progesterone metabolizing enzyme by gonado-
tropin- releasing hormone in cultured granulosa cells.
J. Biol. Chem. 256: 1248-1254.
- 48- Jones, PBC. and Hsueh, AJW. 1983, Modulation of steroi-
dogenic enzymes by gonadotropin releasing hormone in
cultured granulosa cells. In. Factor regulating ovarian
function. Edited by Greenwald. GS. and Terranova, PF.
Raven press, New York. pp. 275-279.
- 49- Kledzik, GS. Cusan, L. Auclair, C. Kelly, PA. and
Labrie, F. 1978. Inhibition of ovarian luteinizing
hormone receptor levels with an LH-releasing hormone
agonist during the estrous cycle in the rat. Fertil.
Steril. 30: 348 - 353.
- 50- Kledzik, GS. Cusan. L. Auclair, C. Kelly. PA. and Labrie, F.
1978b. Inhibitory effect of a luteinizing hormone
releasing hormone agonist on rat ovarian LH and FSH
receptor levels during pregnancy, Fertil. Steril. 29.
560-564.
- 51- Knecht, M. Catt, KJ. 1981 . Gonadotropin-releasing
hormone: Regulation of adenosine 3-5-monophosphate in
ovarian granulosa cell. Science, 214: 1346-1348.

- 52- Knecht, M. Katz, MS. Catt, KJ. 1981. gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation, in cultured rat granulosa cells. J. Biol. Chem. 256: 34-36.
- 53- Leibfried, L. First, NL. 1980 Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. Biol. Reprod. 23:679-704.
- 54- Ling, N. and Vale, W. 1975. Analogs of LH-RF. Synthesis and biological activity of (N-Me)Leu⁷ LRF and D-Ala⁶ (N-Me)Leu⁷ LRF. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63:801-806
- 55- Lowenstein, WR. 1979 Junctional intercellular communication and the control of growth. Biophys. acta. 560:1-56
- 56- Magoffin, DA. Reynolds, DS. Erickson, GF. 1981 Direct inhibitory effect of GnRH on androgen secretion by ovarian interstitial cells. Endocrinology. 109:661-663
- 57- Magoffin, DA. Erickson, GF. 1982 Mechanism by which GnRH inhibits androgen synthesis directly in ovarian interstitial cells. Molec. Cell Endocrinol. 27:191-
- 58- Marshall, JC. Shakespear, RA, Odell, WD. 1976. Pituitary plasma membrane-luteinizing hormone releasing hormone binding: Evidence for the presence of specific binding sites in other tissues. J. Endocrinology. 64:38-
- 59- Matsuo, H. Baby, Y. Nair, PMG. Arimura, A. Schally, AV. 1971. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 1334-1339.

- 60- Minegishi, T. Leung, P.C. 1985. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release by rat granulosa cells. *Endocrinology*. 117:2001.
- 61- Moor, R.M. Smith, M.W. Dawson, R.M.C. 1980. measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp. Cell. Res.* 126: 15-29.
- 62- Moor, R.M. Osborn, J.C. Cran, D.G. Walter, D.E. 1981 Selective effect of gonadotropins on cell coupling, nuclear maturation, and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryology. Exp. Morphol.* 61:34-365.
- 63- Pedersen, T. 1972. Follicle growth in the mouse ovary. In *Oogenesis*. Eds Biggers, J.D. and Shuetz, A.W. University Park press, Baltimore. pp 361-376.
- 64- Peters, H. Byskov, A.G. Himelstein, B.R. and Faber, M. 1975. Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 45: 559-566
- 65- Pitts, J.D. 1977 Direct communication between animal cells. In Brinkley, B.R., and Porter, K.I. (Eds): *International cell biology*. New York. The Rockefeller university press. pp. 43-49
- 66- Pitts, J.D. and Simms, J.W. 1977 Permeability of junctions between animal cells: Intercellular transfer of macromolecules. *Exp. Cell. Res.* 104: 153-163
- 67- Pomerantz, S.H. Channing, C.P. Tsafiriri, A. 1979 Studies on the purification and action of an oocyte maturation inhibitor isolated from porcine follicular fluid. In: *Peptides. Structure and biological function*. Gross E. and Meinhofer, J. Eds. Pierce. Chemical company. Rockford. Ill.

- 58- Racowsky, C. Mcgaughey, R.M. 1982. Further studies of the effects of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. J.Reprod Fertil. 66:505-512
- 69- Ranta, T. Knecht, M. Kody, M. Catt, K.J. 1982 GnRH receptors in cultured rat granulosa cells: Mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. Molec. Cell. Endo. 27:233-240.
- 70- Reddy, B.V. Azhar, S. Mennon, K.M.J. 1980. Multiple inhibitory actions of luteinizing hormone agonist on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-mediated ovarian responses. Endocrinology. 107; 930-936.
- 71- Rippe, R.H. 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
- 72- Sadrkhanloo, R. Hafeditz, C. Erickson, G.F. 1987 Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen treated rat. Endocrinology. 120:146-155.
- 73- Sadrkhanloo, R. 1989. Effect of GnRHa on the ovarian follicular development in the hypophysectomized DES treated rats. J. Vet. Facul. University of Tehran. Vol 3 PP 75-102.
- 74- Schally, A.V. Arimura, A. Kastin, H. Matsuo, H. Baba, Y. Redding, T.W. Nair, R.M.G. Debeljuk, K. White, W.F. 1971 Gonadotropin releasing hormone, one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormone. Science. 173:1300-1308.

- 75-Schally, AV. Arimura, A. Carter. WH. Redding, TW. Geiger, R. Koning, W. Wissman, H. Jaeger, G. Sandow, I. Yanaihara, C. Yoshimoto, T. Sakagani, M. 1972 Ln-releasing hormone activity of Some Synthetic polypeptide fragments Shorter than decapeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 366-375.
- 76-Schwall, R. Erickson, GF. 1981 Functional and morphological Changes in rat theca cells during atresia. In: Dynamics ovarian (Schwartz, NE. and Hanzicker-Wunn, Meds) Raven press, New York. pp. 29-34
- 77-Sorensen, RA. Wassarman, PM. 1976. Relationship between oocyte growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Develop. Biol.* 50: 531-536.
- 78-Stone, SL. Pomerantz, SH. Schwartz-Kipner, A. and Channing CP. 1978 Inhibition of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action. *Biol. Reprod.* 19: 585-592.
- 79-Talbert, GB. Meyer, RK. and Mcshan, WH. 1951 effect of hypophysectomy at beginning of proestrous on maturing follicles in the ovary of the rat. *Endocrinology.* 49: 687-694.
- 80-Tsafriri, A, Channing, CP. 1975 Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of Pig oocytes In Vitro . *J. Reprod Fert.* 43: 149-152.
- 81-Tsafriri, A. Pomerantz, SH. Channing, CP. 1976 Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: Partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.* 14: 511-516.

- 82- Tsafiriri, A. Channing, CP. Pomerantz, SH. Lindner, HR. 1977
Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by
porcine follicular fluid .J.Endocrinology. 75:285-291.
- 83- Tsafiriri, A. Dekel, N. Bar-Ami, S. 1982 the role of oocyte
maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte
maturation. J.Reprod Fert. 64:541-551.
- 84- Tsafiriri, A. Bicsak, TA. Cajander, SB. and Haueh, AJW. 1989
Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue
type plasminogen activator and 2-antiplasmin: Endocr-
inology. 124: 415-421.
- 85- Wang, C. 1983. Luteinizing hormone releasing hormone
stimulates plasminogen activator production by rat
granulosa cells. 112: 1130-1132.
- 86- Ying, SY. Guillemin, R. 1979 (D-Tryp⁶-Pro⁹-Net)-lutein-
izing hormone-releasing factor inhibits follicular
development in hypophysectomized rats. Nature. 280:
593-595.

With respect to the level(%) of a activated oocytes in different size classes of follicles, it has been shown that in the saline treated control group the level(%) of activated oocytes in atretic follicles is very low with a maximum of 5% found at follicles with 200-300um diameter. In the GnRHa treated group 22.5% of all follicles at the size of 100-200um contain activated oocytes while in the sizes of atretic follicle 200-300 and 300-400um of diameter 60% of oocytes respectively had resumed meiotic maturation of oocytes from 1-3 days after GnRHa treatment revealed that after one day of hormone administration, 67.7+2.5% of activated oocytes are in GVBD, 23.9+6% inp B and Met II and only 8.8+3.2.% are cleaved. But after day 2 and 3 of GnRH treatment the percent of cleaved/fragmented oocytes are 56% and 75% respectively.

It is worthy of note that early stages of meiotic process seems normal, but with cleavage the resulting blastomere like cells are not always equal in size or distribution of nuclear materials.

These results clearly demonstrate that (1) There is widespread atresia in the ovaries of the hypophysectomized DES- primed rats (2) One primary action of GnRH agonist in the ovaries of this animal model is to promote atresia of the majority of preantral follicle (3) A great number of oocytes in the above mentioned atretic follicles respond to GnRHa by undergoing meiotic maturation.

2- stages of follicles (Healthy-Atretic) .

3- stages of oocytes (GV, GVBD, PB, Met II, and Cleaved/-
Fragmented).

In this experiment, the diameter of every follicle was determined from basal lamina to basal lamina in the other side. The follicles were then divided into 4 classes based on their diameter, 100µm , 100-200µm, 200-300µm 300-400µm .

As before (71-73) each follicle with 10 or more pyknotic cells in the granulosa compartment of the largest cross section was classified as an atretic follicle. Results of morphometric studies of control ovaries revealed that 36.5%

of the preantral follicles were atretic at day 0 of the experiment (day 4 postoperative) and this number increased to 40% at 24 hours later

but after 24 hours of a single GnRHa injection there was a marked increase (Approximately 25%) in the mean number of the atretic follicles. It should be noted that although all classes of follicles were affected by GnRHa, the action was most pronounced in the larger preantral follicle (those >200µm in diameter). Microscopic studies on stages of oocyte in the atretic . follicles revealed that most of the oocytes (95%) in control DES-treated hypophysectomized rats arrested in the dictyate stage of the first meiotic prophase, whereas a great number of oocytes (40%) from animals treated with GnRHa resume meiotic maturation, and continued GnRHa treatment did not lead to any subsequent induction of meiotic maturation in the pool of non-responding eggs.

GnRH agonist promotes atresia in the population of ovarian preantral follicles, followed by activation of atretic enclosed-oocytes to resume meiosis

Sadrkhanloo, R*

Research done in many laboratories in the last few years, has established that GnRHa induces both inhibitory and stimulatory effects in all components of the ovary. A basic question which remains unanswered concerns to what extent these GnRH actions are affected at level of individual follicles. For this reason, we have investigated whether GnRHa can induce both negative and positive effect on histological structure within the same preantral follicle.

To accomplish this, we employed the immature hypophysectomized DES- treated female rats as a model. The group of animals were injected once per day for 1-3 days with either 100 ug of GnRHa or saline alone as a control group. After 24 hour of the last injection the group of animals were sacrificed by cervical dislocation, the ovaries were removed and collected in cold saline and dissected free from extraneous tissues, The trimmed ovaries were then fixed in Bouin's solution for 4 hours, dehydrated in a graded series of ethyl alcohol, cleared in xylene, embedded in paraffin and serially sectioned at 8um, the ovarian sections were stained with hematoxylin and eosin. In morphometric analyses the following items were considered.

* Department of basic science school of veterinary medicine university of Urmia, P.O. Box 165, Urmia, IRAN.