

Original Article

The Effects of Lithium Chloride on Survival and Function of in Vitro Cultured Human Granulosa Cells

Beiki B., M.Sc., Eftekhari-yazdi P., Ph.D.,* ZeynaliB. , Ph.D., Valojerdi MR., Ph.D., Karimian L., M.Sc., Yazdi RS., M.D., Taghi Abadi ET., B.Sc.

**P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: To investigate the effect of lithium chloride (LiCl) on survival and functional activity of in vitro cultured human granulosa cells (GCs).

Materials and Methods: GCs were isolated from follicular fluid of women undergoing IVF/ICSI. After RBCs removal, GCs were plated in a medium containing varying concentrations of LiCl including 1, 2 and 5mM for two weeks period. A culture without LiCl was taken as control group. To induce apoptosis, the medium of all cultures, on day 14 were replaced by serum free media and the culture was extended for further 24 hour. At the end of cultivation period, apoptosis was assessed by TUNEL and flowcytometry analysis. Furthermore to assess secretional function of the cells in various groups, in some cultures, FSH and androstondion hormones were added and after 48 hours, subsequent secretion of 17- β estradiol was determined by RIA analysis.

Results: The result showed that in GCs treated with 2 and 5 mM LiCl ,apoptosis was statistically decreased more than 50% compared to control group ($P>0.05$) and estradiol secretion increased more than 40% in the GCs treated with 1,2,5 mM LiCl compared to control group.

Conclusion: These results suggest that lithium increase functional activity of GCs and can protect GCs against apoptosis.

Keywords: Granulosa cells, Lithium chloride, Apoptosis, 17- β Estradiol

اثر کلرید لیتیوم بر بقاء و عملکرد سلولهای گرانولوزای انسان در محیط کشت

بهاره بیگی M.Sc.***، پوپک افتخاری یزدی Ph.D.***، بهمن زینلی Ph.D.*، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.***،

لیلی کریمیان M.Sc.*، رضا سلمان یزدی M.D.***، احسان تقی آبادی B.Sc.***

* گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران

** گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

*** گروه ناباروری مردان پژوهشکده رویان

**** گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۶

چکیده

هدف: بررسی تأثیر کلرید لیتیوم بر بقای سلولهای گرانولوزای انسان و میزان ترشح ۱۷بتا استرادیول توسط این سلولها در محیط کشت **مواد و روشها:** سلولهای گرانولوزا از مایع فولیکولار بیماران تحت درمان IVF/ICSI گرفته شد. پس از جداسازی سلولهای خونی، در چهار گروه کشت داده شد. در گروه کنترل سلولها به مدت دو هفته در محیطی که حاوی DMEM/Ham's, F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham) همراه با ده درصد سرم FBS (fetal bovine serum) بود، کشت شدند و در گروه‌های تیمار سلولها در محیط مزبور همراه با دوزهای متفاوت (۱، ۲، ۵ میلی مولار) از کلرید لیتیوم (LiCl) تحت شرایط یکسان کشت داده شدند (گروه‌های تیمار). سپس ۲۴ ساعت قبل از آغاز آنالیز برای القای آپوپتوز، سرم از محیط کشت سلولها حذف شد. میزان وقوع آپوپتوز در این سلولها بوسیله روش رنگ آمیزی فلوسایتومتری و روش TUNEL (TdT mediated dUTP- biotin Nick End Labelling) بررسی شد. همچنین ۴۸ ساعت قبل از آنالیز به محیط کشت هر دو گروه برای تحریک ترشح سلولها، هورمونهای FSH و آندروستندیون افزوده، سپس محیط رویی سلولها برای سنجش میزان ترشح ۱۷بتا استرادیول جمع آوری و با روش Radio RIA Immuno Assay) سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان آپوپتوز سلولهای گرانولوزا که در محیط کلرید لیتیوم کشت داده شده بودند بیشتر از ۵۰ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است ($p < 0.05$). نتیجه آنالیز RIA نشان داد که اگر چه ترشح ۱۷بتا استرادیول توسط سلولها، با افزایش دوز کلرید لیتیوم افزایش یافته است تفاوت آنها با گروه کنترل اختلاف معنی داری ندارد.

نتیجه‌گیری: از نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که کلرید لیتیوم می‌تواند در کاهش میزان آپوپتوز سلولهای گرانولوزا همچنین افزایش عملکرد این سلولها دخیل باشد.

کلیدواژه‌ها: سلولهای گرانولوزا، کلرید لیتیوم، آپوپتوز، ۱۷بتا استرادیول

مقدمه

ترشح ۱۷بتااسترادیول اولین عملکرد شناخته شده سلولهای گرانولوزا در تکامل فولیکولهای تخمدانی است که از طریق سیتوکروم P450 آروماتاز انجام می‌شود [۱]. سلولهای گرانولوزایی که از لحاظ هورمونی فعال هستند اغلب در دیواره جانبی فولیکول تخمدانی جای گرفته اند. به علاوه رشد و بلوغ تخمک به وسیله سلولهای گرانولوزای اطراف حمایت می‌شود [۲]. در طی مراحل اولیه تکامل فولیکول، سلولهای گرانولوزا تکثیر یافته و یک ساختار چند لایه‌ای در اطراف تخمک ایجاد می‌کنند. در ساختار بدون رگ (Avascular) فولیکول تخمدانی، رشد تخمک بواسطه سلولهای گرانولوزای اطراف به خصوص آنهایی که کاملاً به تخمک چسبیده هستند (کرونا رادایاتا) صورت می‌پذیرد. سایر سلولهای گرانولوزا به تدریج تشکیل یک سن سیتیوم داده تا کومولوس اووفروس را ایجاد کنند. تمام این فرآیندها مشتمل بر تکثیر وسیع برخی سلولهای گرانولوزاست ولی مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) برخی دیگر در فولیکول باعث ریمودلینگ آن می‌شود [۳ و ۴]. آپوپتوز به عنوان عملکرد سوم سلولهای گرانولوزا باعث آغاز آترزی فولیکول می‌شود [۵-۸]. از لحاظ بالینی علت برخی ناباروریه‌ها و سیکل‌های ناموفق درمان نازایی عدم تکوین فولیکول به علت آپوپتوز زودرس سلولهای گرانولوزاست [۹ و ۱۰].

مطالعات نشان داده‌اند که مسیر مولکولی Wnt در بافت تخمدان بیان می‌شود [۱۱]. این مسیر در تنظیم بسیاری از مکانیسمهای تکوین از جمله تمایز، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی و بطور کلی الگوزایی ابتدایی جنینی [۱۶-۱۲]، تنظیم تمایز و تکثیر سلولی [۱۹-۱۷] و بسیاری از مکانیسمهای تکوینی نقش مهمی ایفا می‌کند. اخیراً شواهد زیادی گزارش شده است که نشان می‌دهد مسیر Wnt باعث حفاظت سلولها در برابر مرگ سلولی برنامه ریزی شده می‌شود [۲۰]. گلیکوژن سنتتاز کیناز -3 (GSK-3; Glycogen synthetase Kinase -3)

3) از اعضای مهم مسیر Wnt و بعنوان تنظیم کننده منفی این مسیر در جنین اولیه و در اغلب بافتهای بالغ پستانداران بیان می‌شود [۲۱ و ۲۲]. در مسیر Wnt که در اکثر سلولها گزارش شده است، لیگاند Wnt پس از اتصال روی رسپتور خود (frizzled) در غشای سلول باعث فعال شدن پروتئینی به نام dishevelled در سیتوپلاسم می‌شود، این پروتئین با غیر فعال کردن GSK-3 موجب تجزیه نشدن بتا کاتنین شده و آن نیز به نوبه خود پس از انتقال به هسته با اتصال به فاکتور Tcf-Lef^۱ متصل به DNA باعث فعال شدن ژنهای هدف پایین دست می‌شود [۲۳ و ۲۴]. در این خصوص نشان داده شده است که با القای این مسیر از طریق استفاده از لیتیوم که عمل خود را از طریق دخالت در مسیر داخل سلولی Wnt با مهار GSK-3 انجام می‌دهد، سلولهای آدیپوسیت و نورونها در مقابل آپوپتوز حفاظت می‌شوند [۲۰ و ۲۵]. با توجه به شواهد به نظر می‌رسد که مسیر Wnt در تکوین و عملکرد سلولهای گرانولوزا نقش داشته باشد، البته هنوز اطلاعاتی در این خصوص وجود ندارد. بنابراین در این مطالعه با استفاده از کلرید لیتیوم که از مقلدهای مسیر Wnt و مهارکننده GSK-3 است [۲۶]، وجود و نقش این مسیر را در رفتار سلولهای گرانولوزا در محیط کشت به خصوص در بقای سلولها بررسی شد. همچنین تأثیر لیتیوم را بر مهمترین عملکرد سلولهای گرانولوزا یعنی توانایی ترشح استرادیول ارزیابی شد. این سلولها پیش ساز آندروستندیون را از سلولهای تکا دریافت می‌دارند و با کمک هورمون FSH (Follicle Stimulating Hormone) آنرا به استرادیول تبدیل می‌کنند [۲۷ و ۲۸].

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلولهای گرانولوزا

سلولهای گرانولوزا به همراه مایع فولیکولار که طی جداسازی

1. Transcription Factors/Lymphoicid enhancer factor

کف چاهک را پر کردند آنالیزهای مربوطه انجام شد.

القای آپوپتوز

برای القای آپوپتوز ۲ هفته بعد از کشت و ۲۴ ساعت قبل از آنالیزهای مربوط سرم از محیط کشت هر دو گروه کنترل و تیمار حذف شد.

سنجش میزان آپوپتوز

الف) تست TUNEL

۲۴ ساعت پس از حذف سرم و القای آپوپتوز، برای تعیین میزان آپوپتوز از تست TUNEL استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا سلولهای کشت داده شده روی لامل با (Gibco, UK) PBS شسته شده و با پارافمالدئید ۴ درصد (Sigma, USA) به مدت یک ساعت دردمای اتاق تثبیت و پس از شستشوی مجدد با PBS با محلول تراوا کننده غشا^۱ که حاوی ۱/۱ درصد تریتون x-100 (Merk, Germany) در ۱/۱ درصد سیترات سدیم (Sigma, USA) است، به مدت دو دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. پس از دو بار شستشو با PBS ۵۰ میکرولیتر از محلول TUNEL (Roche, Germany) روی سلولها اضافه شده، در محیطی مرطوب، تاریک با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس سلولها با PBS شسته شده و سلولهای چسبیده به لامل در هماتوکسیلین (Counter stain) به مدت چند ثانیه قرار داده شدند. پنج منطقه از هر لامل به صورت تصادفی انتخاب و از هر منطقه تصویرهایی با میکروسکوپ فلورسنس و نوری گرفته شد سپس سلولهای آپوپتوزی رنگ شده در تصویر فلورسنس هر منطقه شمارش شده و درصد آن نسبت به کل سلولهای شمارش شده در تصویر نوری همان منطقه محاسبه شد.

اووسیت‌های نابالغ از بیماران تحت درمان IVF/ICSI به دست آمده است، به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۶۵۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی دورریخته شده و رسوب سلولی باقیمانده درته لوله که حاوی سلولهای گرانولوزا و سلولهای خونی است، پس از حل شدن در ۲/۵ میلی لیتر محیط تایرود نمکی (۲۶۵ میلی گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ؛ ۲۱۴ میلی گرم $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ؛ ۲۰۰ میلی گرم NaHCO_3 ؛ ۸۰۰۰ میلی گرم NaCl ؛ ۵۰ میلی گرم NaH_2PO_4 و ۱۰۰۰۰ میلی گرم D-Glucose) روی شیب غلظتی که حاوی ۲/۵ میلی لیتر (Puresperm (Nidacon, Sweden) و ۲/۵ میلی لیتر محیط نمکی تایرود (به ترتیب) است برده شد تا سلولهای گرانولوزا از سلولهای خونی جدا شود، پس از سانتریفیوژ تحت ۱۰۰۰g به مدت ۱۳ دقیقه، سلولهای گرانولوزا جدا شده و تشکیل یک حلقه سفید رنگ را بر روی لایه سلولهای خونی می دهند. این سلولها به آرامی توسط پیست پاستور جمع آوری شده و توسط محیط کشت DMEM/Ham,F12 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS (Gibco, UK) شسته شده و پس از سانتریفیوژ برای جداسازی سلولهای گرانولوزا از یکدیگر مقداری هیالورونیداز (Sigma, USA) به مدت چند ثانیه به آن افزوده شد. سپس با استفاده از محیط، رقیق و مجدداً سانتریفیوژ شد. پس از دور ریخته شدن محیط رویی و حل کردن سلولها در ۱ میلی لیتر دیگر از محیط Viability توسط تریپان بلو (Sigma, USA) تعیین و با استفاده از لام نئوبار تعداد سلولها شمارش و سپس کشت داده شد. در هر چاهک از یک پتری دیش ۱۲ چاهکی دو بیست هزار سلول ریخته شده و به ۲ تا از این چاهکها محیط DMEM/Ham,F12 همراه با ۱۰ درصد FBS (گروه کنترل) و بترتیب به چاهکهای بعدی محیط مزبور حاوی سرم همراه با دوزهای متفاوت (۱، ۲، ۵، ۱۰ میلی مولار) از کلرید لیتیوم افزوده شد (گروههای تیمار) و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند پس از ۲ هفته که سلولها تکثیر یافتند و

1. permeabilisation solution

ب) فلو سائیتومتری

تعداد 6×10^6 سلول از هر دو گروه کنترل و تیمار که ۲۴ ساعت تحت شرایط بدون سرم بودند با PBS شسته شده و برای جداسازی از کف ظرف به مدت ۳ دقیقه تحت تاثیر ۲۵۰ میکرو لیتر (Gibco, UK) Tripsin/EDTA قرار گرفتند. فعالیت تریپسین با افزودن محیط حاوی ۱۰ درصد سرم FBS متوقف شد. پس از سانتریفیوژ (۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰) با Binding buffer شستشو و سپس ۱ میکرو لیتر Annexin V و ۲/۵ میکرو لیتر propidium iodide به آنها اضافه، به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و در نهایت با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (Becton Dickinson; BD) تعداد سلولها شمارش شد.

اندازه گیری میزان ترشح ۱۷ بتااسترادیول با**استفاده از Radio Immuno Assay**

دو هفته بعد از کشت، برای تحریک ترشح ۱۷ بتااسترادیول سلولهای گرانولوزا 4×10^6 ساعت تحت تاثیر 3×10^{-7} واحد در لیتر از هورمون FSH و ۱۰ میکرومول در لیتر از هورمون آندروستندیون قرار داده شدند. سپس به کمک روش (Radio Immuno Assay) RIA میزان ترشح سلولها سنجیده شد. به این ترتیب که ابتدا محیط رویی سلولها جمع آوری شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر رادیول استرادیول که شامل ید رادیواکتیو و بافر آن است به محیط اضافه و در تیوپهای ویژه با هم مخلوط شد و دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از شستشو با ۱ میلی لیتر بافر برای سنجش در اختیار دستگاه قرار گرفت.

آنالیز آماری

نتایج دو گروه کنترل و تیمار با استفاده از آزمونهای آماری آنالیز شدند. برای بررسی میزان آپوپتوز در روش TUNEL

وفلوسائیتومتری و برای مقایسه اختلاف درصد آنها بین گروهها از تست T استفاده شد. همچنین برای بررسی میزان اختلاف ترشح استرادیول به صورت دوجه دو در بین گروهها از تست Mann - whitney استفاده شد. سطح معنی داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد. تمام آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS (Software Program, version XI, SPSS. Ink, Chicago, USA) انجام شد.

یافته‌ها**سنجش میزان آپوپتوز**

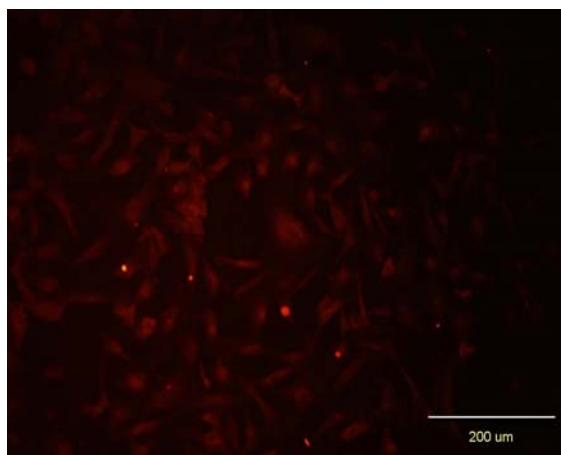
پس از کشت اولیه سلولهای گرانولوزا در محیط DMEM/Ham,F12 همراه با ده درصد سرم، سلولها به مدت دو هفته با دوزهای ۲،۱ و ۵ میلی مولار کلریدلیتیوم (دوز مناسب در شرایط *in vivo*) تیمار شدند، سپس آپوپتوز آنها با روش TUNEL و فلوسائیتومتری بررسی شد.

الف) تست TUNEL

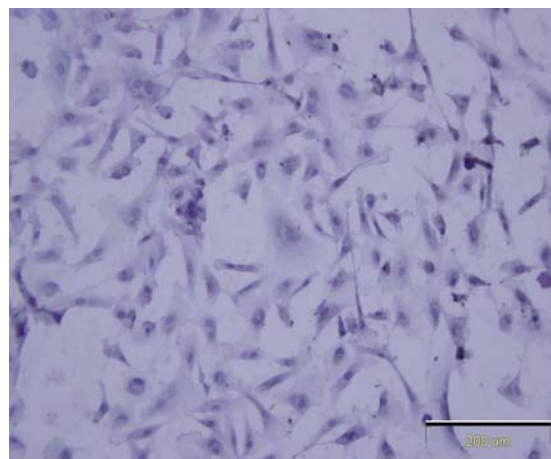
برای مشاهده اثر کلریدلیتیوم بر آپوپتوز سلولهای گرانولوزا از رنگ آمیزی TUNEL استفاده شد که در آن رنگ مزبور به انتهای OH-3 کروموزومهای قطعه قطعه شده سلولهای آپوپتوتیک متصل شده و با میکروسکوپ فلورسنس نور قرمز از خود ساطع می کند (شکل ۱). در این بررسی میزان آپوپتوز در ۵ گروه سنجیده شد که گروهها شامل گروه کنترل بدون حذف سرم، گروه کنترل پس از حذف سرم و سه گروه تیمار ۲،۱ و ۳ که به ترتیب سلولها با دوزهای ۱، ۲ و ۵ میلی مولار از کلریدلیتیوم تیمار شده بودند. میانگین آپوپتوز اندازه گیری شده در گروه اول که گروه کنترل بدون حذف سرم بود $0.7 \pm$ درصد نسبت به کل سلولها بود که در گروه کنترل پس از حذف سرم این مقدار آپوپتوز به $1/4 \pm 25$ درصد افزایش یافت. و در گروه تیمار اول (دوز ۱ میلی مولار کلریدلیتیوم) به

سلولی در هر سه گروه تیمار کاهش معنی داری ($p < 0.05$) با گروه کنترل دوم (پس از حذف سرم) دارد. البته این تفاوت در گروه تیمار سوم که سلولها در آن تحت تأثیر غلظت ۵ میلی مولار قرار گرفته‌اند بیشتر است.

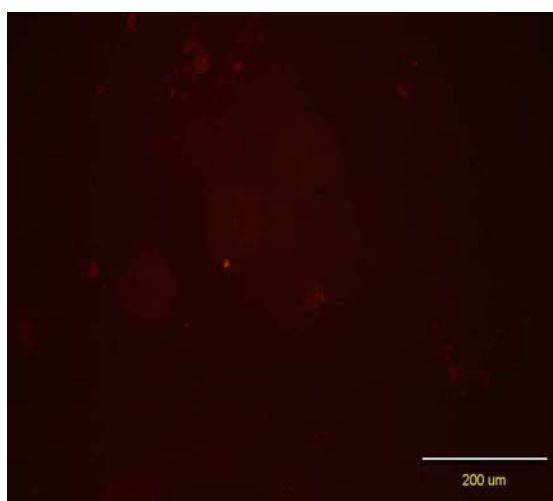
درصد و درگروه تیماردوم (دوز ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم) به $16 \pm 2/7$ درصد و در گروه تیمار سوم (دوز ۵ میلی مولار کلریدلیتیوم) به $14 \pm 2/9$ درصد کاهش یافت (شکل ۲). مقایسه آماری این گروه‌ها نشان داد که درصد مرگ



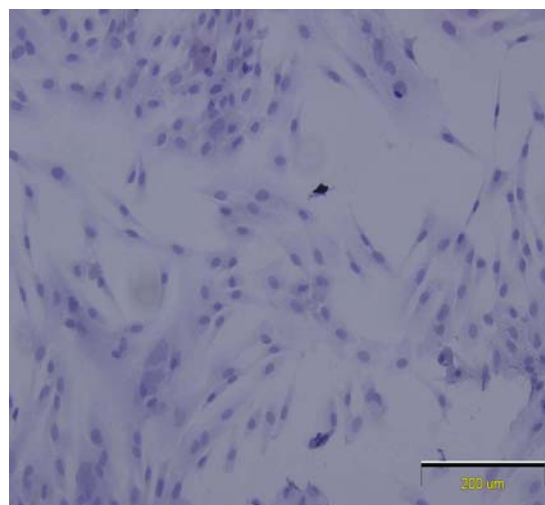
ب



الف



د



ج

شکل ۱. فتومیکروگراف سلولهای گرانولوزا (گروه کنترل و تیمار).

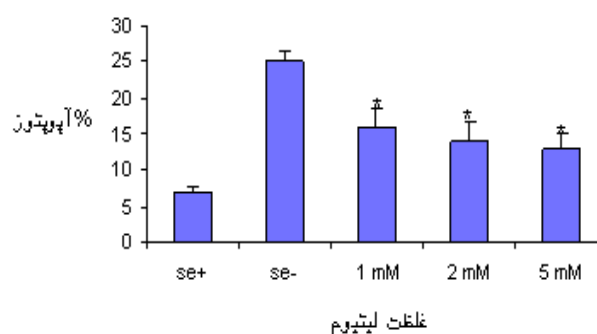
الف: تصویر نوری از سلولهای گرانولوزا پس از ۲۴ ساعت تیمار در محیط کشت فاقد سرم که با هماتوکسیلین رنگ شده است. ب: رنگ آمیزی TUNEL تصویر الف و مشاهده با نور فلورسنس. رنگ قرمز سلولها نشان دهنده آپوپتوز است. همان‌طور که مشاهده می‌شود اکثریت سلولها بر اثر حذف سرم دچار آپوپتوز شده‌اند. ج: تصویر نوری از سلولهای گرانولوزا پس از ۲۴ ساعت تیمار در محیط کشت فاقد سرم و پیش تیمار ۱۴ روزه با غلظت ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم که با هماتوکسیلین رنگ شده است. د: رنگ آمیزی TUNEL تصویر ج و مشاهده با نور فلورسنس. رنگ قرمز سلولها، نشان دهنده آپوپتوز است همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد سلولهای قرمز رنگ (آپوپتوزی) به طور چشمگیری کاهش یافته است.

سنجش ترشح ۱۷ بتا استرادیول

برای اندازه گیری میزان ترشح ۱۷ بتا استرادیول، محیط کشت سلولها جمع آوری شده و با روش RIA سنجش انجام شد. در این اندازه گیری میزان ترشح سلولها در گروه کنترل با سه گروه تیمار که به ترتیب شامل دوز ۲ و ۵ میلی مولار کلریدلیتیوم بود مقایسه شد. میانگین ترشح سلولها در گروه کنترل $114/95 \pm 327/56$ پیکومول برلیتر بود که این میزان در گروه تیمار اول به $165/45 \pm 578/78$ پیکومول برلیتر، در گروه تیمار دوم به $179/153 \pm 609/98$ پیکومول برلیتر و در گروه تیمار سوم به $87/08 \pm 417/08$ پیکومول برلیتر رسید (شکل ۵). با وجود افزایش، آنالیز آماری اختلاف معنی داری را در گروه‌های تیمار نسبت به کنترل نشان نداد ($p > 0.05$).

بمٹ

با وجود اینکه محققین نشان داده‌اند که مولکولهای مسیر Wnt در تخمدان و بخصوص در سلولهای گرانولوزا بیان می‌شوند [۱۱]، هنوز نقش مسیر سیگنال دهی Wnt در تکوین و عملکرد این سلولها روشن نیست. در این مطالعه نقش کلرید لیتیوم به‌عنوان مقلد مسیر Wnt بر عملکرد سلولهای گرانولوزا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، پس از القای آپوپتوز با افزایش دوز کلرید لیتیوم کاهش معنی داری در میزان آپوپتوز سلولها در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. نتایج بررسی فلوسایتومتری نیز نتایج تست TUNEL را تایید می‌کند. در مجموع نتایج نشان داد که کلریدلیتیوم سلولها را در مقابل مرگ سلولی حفاظت می‌کند. این نتایج قابل مقایسه با نتایج به‌دست آمده توسط Cross و همکارانش در سال ۲۰۰۱ است مبنی بر اینکه مهار GSK-3 به‌واسطه مولکولهای مهارکننده از جمله کلرید لیتیوم موجب محافظت قابل توجه نورونها در برابر آپوپتوزیس در محیط کشت می‌شود. [۲۵]. Longo و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که مهار GSK-3 توسط لیتیوم سبب القای مسیر Wnt در سلولهای آدیپوسیت و بیان ژنهای آنتی آپوپتوتیک



شکل ۲. اندازه‌گیری وقوع آپوپتوز در سلولهای گرانولوزای گروه‌های کنترل و تیمار به روش رنگ آمیزی TUNEL. میانگین آماری مربوط به نتایج آزمون TUNEL سلولهای گرانولوزا پس از ۲۴ ساعت تیمار در محیط کشت فاقد سرم و پیش تیمار ۱۴ روزه با غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم نشان داده شده است همان‌طور که ملاحظه می‌گردد غلظت ۵ میلی مولار بیشترین محافظت را بر علیه آپوپتوزیس نشان داده است. مقادیر بیانگر میانگین \pm انحراف معیار و * نشان دهنده $p < 0.05$ است. se- محیط کشت فاقد سرم؛ se+ محیط کشت دارای سرم

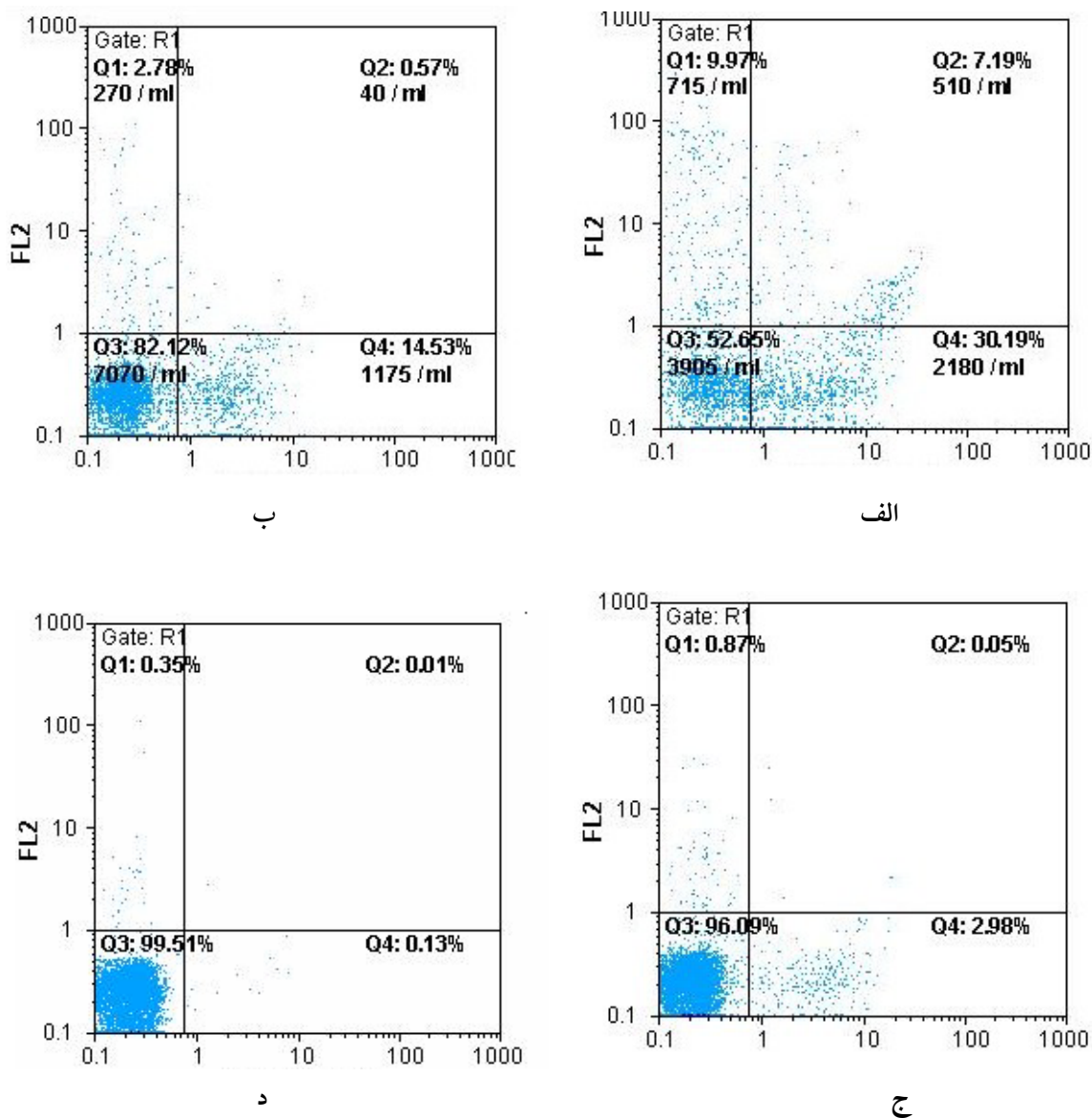
ب) فلوسایتومتری

میزان مرگ سلولی همچنین به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در این روش نیز رنگ مورد نظر Annexin (۷ به فسفاتیدیل سرینی که در جریان فرایند آپوپتوز به سطح بیرونی غشاء منتقل می‌شود متصل شده و رنگ سبز از خود ساطع می‌کند (ناحیه Q4 در شکل ۳)). در این بررسی نیز وقوع آپوپتوز در ۵ گروه با هم مقایسه شد. میزان آپوپتوز اندازه گیری شده در گروه اول که گروه کنترل قبل از حذف سرم بود $2 \pm 0/5$ درصد بود که این میزان پس از حذف سرم به $3/7 \pm 15$ درصد در گروه کنترل دوم افزایش یافت. در گروه تیمار اول (دوز ۱ میلی مولار کلریدلیتیوم) میزان آپوپتوز به $3/5 \pm 11$ درصد و در گروه تیمار دوم (دوز ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم) به $3/1 \pm 8$ و در گروه تیمار سوم (دوز ۵ میلی مولار کلریدلیتیوم) به $2/5 \pm 7$ درصد کاهش یافت (شکل ۴). مقایسه آماری این گروه‌ها نشان داد که درصد مرگ سلولی گروه تیمار دوم و سوم با گروه کنترل دوم اختلاف معنی داری دارد ($p < 0.05$)، اما اختلاف گروه تیمار اول (دوز ۱ میلی مولار کلریدلیتیوم) با گروه کنترل دوم از نظر آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$).

شواهد موجود مبنی بر وجود اعضای مسیر Wnt در سلولهای گرانولوزا و با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر به نظر می رسد لیتیوم با تاثیر بر مسیر Wnt سبب بیان ژنهای آنتی آپوپتوتیک در این سلولها شده باشد.

مانند IGF-I و IGF-II در این سلولها شده و سبب می شود که این سلولها در برابر آپوپتوز ناشی از نبود سرم در محیط کشت مقاومت نشان دهند [۲۰].

از آنجایی که ثابت شده است لیتیوم مهار کننده GSK-3 است با



شکل ۳. پراکنش فلوسایتومتریک سلولهای گرانولوزا پس از ۲۴ ساعت تیمار در محیط کشت فاقد سرم و پیش تیمار ۱۴ روزه با غلظتهای ۱ و ۵ میلی مولار کلرید لیتیوم.

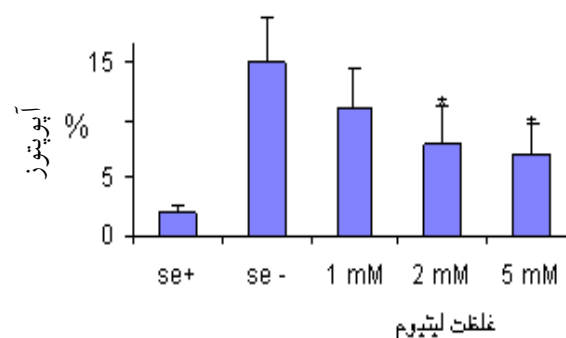
نواحی Q1 تا Q4 به ترتیب عبارتند از: Q1: سلولهای نکروتیک، Q2: سلولهای مرده، Q3: سلولهای زنده، Q4: سلولهای آپوپتوتیک.
 الف: گروه کنترل
 ب: گروه آزمون با دوز ۱ میلی مولار کلرید لیتیوم
 ج: گروه آزمون با دوز ۲ میلی مولار کلرید لیتیوم
 د: گروه آزمون با دوز ۵ میلی مولار کلرید لیتیوم
 همان طور که در شکل پیداست تعداد سلولهای گرانولوزای آپوپتوزی در ناحیه Q4 با افزایش دوز کلرید لیتیوم کاهش یافته است

لیتیوم بود. نتایج به دست آمده قابل مقایسه با یافته‌های (Allagui) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ است [۲۹]. این محققین میزان ترشح تیروکسین، تستوسترون و استرادیول را در سرم رتهای تحت القاء لیتیوم اندازه گیری کردند و نشان دادند که با وجود کاهش سطح تستوسترون و توقف اسپرما توژنز در نرها، در حیوانات ماده سطح استرادیول افزایش یافته است. مقایسه این نتایج با یافته‌های ما نشان می‌دهد که لیتیوم می‌تواند بر عملکرد ترشحی سلولهای گرانولوزا مؤثر باشد اما این موضوع که لیتیوم از طریق چه مکانیزم و مسیری بر عملکرد ترشحی سلولهای گرانولوزا تأثیر می‌گذارد هنوز به طور کامل مشخص نیست و جای تحقیق بیشتری دارد. شاید علاوه بر تأثیر بر بیان ژنهای آنتی آپوپتیک، بیان ژنهای منتهی به ترشح و پروتئینهای رسپتوری را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد و به این وسیله علاوه بر عملکرد آنتی آپوپتیک به نوعی باعث بلوغ سلولهای گرانولوزا که نتیجه آن افزایش میزان ترشح ۱۷بتا استرادیول است می‌شود.

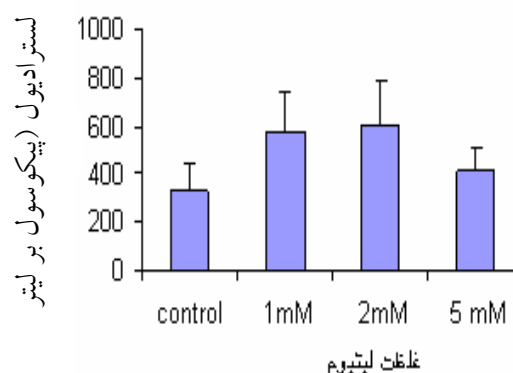
در مجموع این نتایج نشان دهنده تأثیر مثبت کلریدلیتیوم بر مهار آپوپتوز و افزایش عملکرد سلولهای گرانولوزاست. با توجه به نتایج آزمونهای TUNEL و فلوسایتومتری می‌توان دوزه ۲ میلی مولار را به عنوان دوز مناسب برای عملکرد لیتیوم معرفی کرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مشترک بین پژوهشکده رویان و دانشگاه تهران به شماره ۲-۲۴۸ است که محل اجرای آن در بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانه مسئولین محترم پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.



شکل ۴. اندازه‌گیری وقوع آپوپتوز در سلولهای گرانولوزای گروههای کنترل و تیمار به روش فلوسایتومتری. میانگین آماری مربوط به پراکنش فلوسایتومتری سلولهای گرانولوزا پس از ۲۴ ساعت تیمار در محیط کشت فاقد سرم و پیش تیمار ۱۴ روزه با غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد غلظت ۵ میلی مولار بیشترین محافظت را بر علیه آپوپتوزیس نشان داده است. مقادیر بیانگر میانگین \pm انحراف معیار و * نشان دهنده $p < 0.05$ است. se-: محیط کشت فاقد سرم



شکل ۵. اندازه‌گیری میزان ترشح ۱۷بتا استرادیول در سلولهای گرانولوزای گروههای کنترل و تیمار به روش RIA. سنجش میزان ترشح ۱۷بتا استرادیول در سلولهای گرانولوزا پس از ۴۸ ساعت تیمار با هورمون در محیط کشت حاوی FSH و آندروستندیون و پیش تیمار ۱۴ روزه با غلظتهای ۱ و ۲ میلی مولار کلریدلیتیوم نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود کلریدلیتیوم سبب افزایش ترشح استرادیول شده است. مقادیر بیانگر میانگین \pm انحراف معیار است

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان ترشح استرادیول نشان دهنده افزایش میزان ترشح این هورمون با افزایش دوز کلرید

References

1. **Erickson GF, Hsueh AJW.** Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1978; 102: 1275-82.
2. **Buccione R, Schroeder AC, Eppige JJ.** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990; 43: 543-7.
3. **Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 27-45.
4. **Kapia A, Hsueh AJ.** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 349-63.
5. **Hughes FM, Gorospe WC.** Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129: 2415-22.
6. **Tilly JL, Kowalski KJ, Johnson AL, Hsueh AWJ.** Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-801.
7. **Tilly JL, Billing H, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AWJ.** Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocr* 1992; 6: 1942-50.
8. **Gougeon A.** Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 121-55.
9. **Nakahara K, Saito H, Saito T.** The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1997; 68: 312-17.
10. **Oosterhuis GJE, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I.** Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998; 70: 747-9.
11. **Ricken A, Lochhead P, Kontogianna M, Farookhi R.** wnt signaling in the ovary: Identification and compartmentalized expression of wnt 2b, and Frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* 2002; 143: 2741-4.
12. **Cadigan KM, Nusse R.** wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11: 3286-305.
13. **Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT.** Mechanism and Function of signal transduction by the wnt/beta-catenin and wnt/ca+2 pathways. *Oncogene* 1999; 18: 7860-72.
14. **Siegfried E, Perrimon N.** Drosophila wingless: a paradigm for the function and mechanism of wnt signaling. *Bio assays* 1994; 16: 395-404.
15. **Wodarz A, Nusse R.** Mechanisms of wnt signaling in development. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 59-88.
16. **Nusse R.** A versatile transcriptional effector of wingless signaling. *Cell* 1997; 89: 321-323.
17. **Nusse R, Van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus HE.** Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984; 307: 131-6.
18. **Peifer M, Polakis P.** wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287: 1606-9.
19. **Polakis P.** wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-51.
20. **Longo KA, Kennell JA, Ochocinska MJ, Ross SE, Wright WS, Mac Dougaldio A.** wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J Biol Chem* 2002; 277: 38239-44.
21. **Amdisen A.D.** Reagents for lithium electrodes and sensors for blood serum analysis. *Handbook of Lithium Therapy.* MTP Press Lancaster UK 1986.
22. **Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR.** Glycogen synthetase Kinase-3:

- Functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* 1992; 114: 147-62.
23. **Bullions LC, Levine AJ.** The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol* 1998;10 :81-7.
 24. **Polakis P.** The oncogenic activation of B-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 15-21.
 25. **Cross DA, Culbert A, Chalmer KA, Skaper SD, Reith AD.** Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurons from death. *J Neurochem* 2001; 77: 94-102.
 26. **Klein PS, Melton DA.** A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8455-9.
 27. **Sasano H, Okamoto M, Mason J, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG.** Immuno localization of aromatase 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P- 450 in the human ovary. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 163-9.
 28. **Bjersing L.** On the morphology and endocrine function of granulosa cells in ovarian follicles and corpora lutea. Biochemical, histochemical, and ultrastructural studies on the porcine ovary with special reference to steroid hormone synthesis. *Acta Endocrinol Suppl* 1968; 125: 1-23.
 29. **Allagui MS, Hfaiedh N, Vincent C, Guermazi F, Murat JC, Croute F, Elfeki A.** Changes in growth rate and thyroid- and sex-hormones blood levels in rats under sub-chronic lithium treatment. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25: 243-50.