

## Original Article

# Mechanism of Lithium's Effect on Follicular Development of the Rat Ovary

Fahimeh Mirakhori, M.Sc.<sup>1</sup>, Azita Parvaneh Tafreshi, Ph.D.<sup>2</sup>, Ameneh Shirmohamadian, M.Sc.<sup>1</sup>,  
Mohammad Reza Baghaban Eslaminejad, Ph.D.<sup>3,4</sup>, Ghamartaj Hossein, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Bahman Zeynali, Ph.D.<sup>1\*</sup>

1. School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Department of Biochemistry, The National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3. Department of Embryology, Royan Institute Reproductive for Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

4. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

\* Corresponding Address: P.O.BOX: 14155-6455, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran  
Email: bzeynali@Khayam.ut.ac.ir

Received: 18/Apr/2009, Accepted: 17/Nov/2009

### Abstract

**Objective:** It has been shown that lithium chloride (LiCl), an effective drug for the treatment of bipolar disorder, has side effects on the female reproductive system. In this study, cellular and histological effects of lithium chloride on the development of ovarian follicles in immature female rats were investigated.

**Materials and Methods:** To induce ovarian follicular development, twenty-three day old immature female rats were injected with 10 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), followed by four doses of LiCl (250 mg/kg/dose) each injected every 12 hours, starting from the time of the PMSG injection. The rat ovaries were removed 48 hours after the PMSG injection and prepared for histological, immunohistochemical, and DNA laddering studies. Control immature female rats received only PMSG, while sham treated rats received PMSG and physiological serum (lithium vehicle).

**Results:** Our results showed that in the ovaries of LiCl-treated rats there were neither large antral follicles (800-1000  $\mu$ m) nor fewer medium sized follicles (400-800  $\mu$ m) but a increased number of atretic follicles compared to those in the control rats. The induction of atresia in the ovaries of LiCl-treated rats was further confirmed by the presence of DNA fragmentation. Looking at the cellular levels, lithium extremely significant ( $p < 0.0001$ ) increased the number of TUNEL-positive cells in the granulosa layer of the antral follicles.

**Conclusion:** Taken together, our results suggest that lithium may decrease folliculogenesis by inducing apoptosis in the antral follicles.

**Keywords:** Lithium Chloride, Apoptosis, Ovarian Follicle, Immature Rat

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 267-274

## مکانیسم اثر کلرید لیتیم در تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش‌های صحرایی

فهیمة میرآخوری M.Sc.، آزیئا پروانه تفرشی Ph.D.، آمنه شیرمحمدیان M.Sc.، محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد Ph.D.،  
قمرتاج حسین Ph.D.، بهمن زینلی Ph.D.\*

۱. دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه تکوین، تهران، ایران
۲. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی، تهران، ایران
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
۴. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

\* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه تکوین  
پست الکترونیک: Email: bzeynali@Khayam.ut.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۲۶

### چکیده

\* **هدف:** بررسی اثر کلرید لیتیم در تکوین فولیکول‌های تخمدانی موش‌های صحرایی نابالغ تحریک شده با گنادوتروپین با تکیه بر شاخص‌های سلولی و بافتی

\* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، از موش‌های صحرایی ماده نابالغ (۲۳ روزه، نژاد Wistar) به عنوان مدل استفاده گردید. جهت تحریک تکوین فولیکولی، ابتدا ۱۰ واحد بین‌المللی Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) و سپس جهت بررسی اثر لیتیم، ۴ دوز کلرید لیتیم (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) هر ۱۲ ساعت (از زمان تزریق PMSG) به صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG تخمدان‌ها خارج و مورد بررسی‌های سلولی و بافتی قرار گرفتند. جهت بررسی آپوپتوزیس از رنگ‌آمیزی TUNEL و روش DNA laddering استفاده شد. موش‌هایی که تنها PMSG را دریافت کرده بودند گروه کنترل، موش‌هایی که علاوه بر PMSG سرم فیزیولوژیک (حلال لیتیم) را نیز دریافت کرده بودند گروه دارو نما و موش‌هایی که هیچ یک را دریافت نکرده بودند به عنوان موش‌های گروه دست نخورده در نظر گرفته شدند.

\* **یافته‌ها:** طی بررسی‌های انجام شده بافتی تخمدان موش‌های بیمار شده با کلرید لیتیم، عدم وجود فولیکول‌های آنترال با قطر ۱۰۰۰-۸۰۰ میکرون، کاهش تعداد فولیکول‌های آنترال با قطر ۶۰۰-۴۰۰ و ۸۰۰-۶۰۰ میکرون و افزایش تعداد فولیکول‌های آنتریک نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مطالعات در سطح سلولی حاکی از افزایش شدید تعداد سلول‌های با هسته پیکنوتیک و TUNEL مثبت در لایه سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال تخمدان موش‌های بیمار شده با کلرید لیتیم نسبت به گروه کنترل بود. به علاوه الگوی قطعه قطعه شدن DNA فقط در نمونه‌های تجربی مشاهده شد.

\* **نتیجه‌گیری:** پیشنهاد می‌شود که کلرید لیتیم با القای آپوپتوزیس در سلول‌های گرانولوزا موجب افزایش فولیکول‌های آنتریک و در نتیجه کاهش تعداد فولیکول‌های آنترال و تکوین فولیکولی می‌شود.

\* **کلیدواژگان:** کلرید لیتیم، آپوپتوزیس، فولیکول‌های تخمدانی، موش صحرایی نابالغ

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۷۴-۲۷۶

### مقدمه

گرانولوزا در آنها متوقف شده و دچار آپوپتوزیس می‌شوند. به نظر می‌رسد که آغاز آپوپتوزیس در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال تحت کنترل هورمون‌های فعال‌کننده مسیرهای پیام‌رسانی پاراکرین/اتوکرین داخل تخمدانی است (۴). هورمون‌های استروژنی، اصلی‌ترین نقش را در تنظیم رشد، تکوین، هموستازی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در تخمدان دارند. مطالعات انجام شده نشان داده است که کاهش سطوح گنادوتروپین‌ها، موجب آتزی و وسیع فولیکولی در تخمدان می‌شود. این آپوپتوزیس القا شده را می‌توان با به کارگیری Follicle Stimulating Hormone (FSH) در شرایط *in vitro* کاهش داد. علاوه بر FSH، استرادیول (مهم‌ترین هورمون‌های استروژنی تخمدان) نیز موجب مهار آپوپتوزیس ناشی از کاهش گنادوتروپین‌ها می‌شود (۵).

بر خلاف وجود گزارش‌های متعدد از اثرات درمانی لیتیم در درمان بیماری دوقطبی - که نوعی اختلال روانی همراه با دوره‌هایی از افسردگی و سرخوشی است - اثرات منفی آن نیز بر سیستم تولید مثلی ماده و مشکلات در باروری به عنوان یکی از آثار جانبی مصرف این دارو گزارش شده است (۶). مصرف لیتیم در بیماران دوقطبی

در طول هر دوره جنسی در تخمدان، تعداد زیادی فولیکول شروع به رشد می‌کند اما بیشتر آنها موفق به تکوین نهایی نشده و دست‌خوش روندی به نام آتزی می‌شوند. شواهد موجود نشان می‌دهد که آپوپتوزیس سلول‌های گرانولوزا، مکانیسم اصلی آتزی فولیکول‌های تخمدان می‌باشد (۱، ۲). تکوین موفق فولیکول، وابسته به حضور استروئیدها و فاکتورهای رشدی است که تکوین فولیکولی را تحریک می‌کند و هم‌چنین موجب حفاظت سلول‌ها در مقابل آپوپتوزیس می‌شود (۳). رشد و تکوین فولیکول‌های تخمدانی توسط روند تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزا صورت می‌گیرد. در مراحل اولیه رشد فولیکولی (آغازین و اولیه) سلول‌های گرانولوزا، تکثیری آهسته دارند ولی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های پراآنترال به تحریکات گنادوتروپین‌ها پاسخ داده و مقادیر زیادی استرادیول ترشح می‌کنند، بنابراین با در معرض قرارگیری سلول‌های گرانولوزا با گنادوتروپین‌ها و استرادیول، فاز تکثیری سریع‌تر شده و فولیکول‌های آنترال ایجاد می‌شوند. به هر حال، بیشتر فولیکول‌های آنترال به مرحله پیش از تخمک‌گذاری نمی‌رسند به طوری که تکثیر سلول‌های

## لیتیم و تکوین فولیکول تخمدانی

جهت تحریک تکوین فولیکولی، موش‌های مورد آزمایش (PMSG) Pregnant Mare Serum Gonadotropin 10 IU به صورت درون صفاقی و سپس هم‌زمان با تزریق PMSG جهت بررسی اثر لیتیم، ۴ دوز کلرید لیتیم (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) هر ۱۲ ساعت دریافت کردند. ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG، تخمدان‌ها خارج و جهت انجام بررسی‌های هیستولوژیک آماده گردیدند. زمان تزریق‌ها بر اساس نیمه عمر لیتیم در خون (۴ ساعت، نمودار ۱)، هر ۱۲ ساعت یکبار انتخاب شد تا بدین ترتیب غلظت لیتیم در خون همواره بالاتر از سطح فیزیولوژیک آن باقی بماند.

### سنجش میزان لیتیم در خون

به منظور سنجش میزان لیتیم در خون، ۱، ۸۴، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق یک دوز کلرید لیتیم (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ابتدا موش‌ها با اتر بی‌هوش و حدود یک میلی‌لیتر خون از قلب آنها گرفته شد. پس از قرار دادن خون به مدت ۲ ساعت در یخچال، با دور ۳۰۰۰-۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و از سرم رویی برای سنجش لیتیم خون به روش Flame Photometry استفاده شد.

### شمارش فولیکولی

۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG، تخمدان‌ها از محوطه شکمی خارج و جهت مطالعات بافتی با محلول بوئن تثبیت شدند. پس از مراحل آب‌گیری در سری صعودی الکل‌ها، شفاف‌سازی در زایلن و پارافین‌گیری، برش‌های ۷ میکرونی به صورت سریال از کل تخمدان تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین - اتوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. سپس فولیکول‌های آنترال با قطرهای (۶۰۰-۸۰۰، ۴۰۰-۶۰۰، ۱۰۰۰-۸۰۰ میکرون) و فولیکول‌های آنترتیک با مشخصه‌های مورفولوژیکی از قبیل وجود هسته‌های پیکنوتیک و عدم سازماندهی سلول‌های گرانولوزا، اووسیت چندبخشی شده و غوطه‌ور در آنتروم که قبل از نیز به عنوان مشخصه‌های فولیکول‌های آنترتیک گزارش شده است (۱۳) شمارش شدند. در این بررسی فولیکول‌های حاوی هسته اووسیت، از هر ۱۰ برش یکی شمارش شد تا بدین ترتیب از دو بار شمارش، یک فولیکول آنترال بزرگ - که به تقریب هسته‌ای به قطر ۷۰ میکرون دارد - جلوگیری به عمل آید (۱۴).

### سنجش میزان آپوپتوزیس

#### الف) آزمون Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TUNEL) Mediated dUTP Nick End Labeling

۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG تخمدان‌ها خارج، با پارافرم آلدئید ۴ درصد تثبیت و برش‌های ۷ میکرونی از قالب‌های پارافینی تهیه گردید. بعد از مراحل پارافین‌زدایی و آب‌دهی، لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سیترات ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق با محلول بلوکه کننده Bovine Serum Albumin (BSA) ۴ درصد (Sigma)، انکوبه شدند. پس از شست‌وشو با محلول فسفات بافر سالین (Phosphate Buffer Saline; PBS)، مقاطع بافتی در ۵۰ میکرولیتر از مخلوط TUNEL و آنزیم (Roche) بافر کیت - به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتاق تاریک و مرطوب انکوبه شدند (در نمونه‌های کنترل منفی آنزیم حذف شد و تنها از بافر کیت استفاده شد). آنزیم نوکلئوتیدهای نشان‌گذاری شده را در انتهای آزاد ۳-OH DNA های قطعه قطعه شده قرار داده و آنها را قابل شناسایی می‌کند. پس از شست‌وشو

موجب اختلال در سیکل جنسی و سیستم تولید مثلی آنها می‌شود (۷). هم‌چنین گزارش شده است که لیتیم موجب کاهش قابل توجه در سطوح پلاسمایی گنادوتروپین‌ها، پرولاکتین و تستوسترون در رت و انسان می‌شود (۸). در این اواخر نشان داده شده است که تیمار موش‌های صحرایی ماده بالغ با کلرید لیتیم باعث کاهش تعداد فولیکول‌های در حال رشد و گراف و کاهش سنتز استروئیدهای تخمدانی می‌شود (۶، ۹).

تمامی شواهد فوق دلالت بر این دارد که لیتیم موجب کاهش باروری می‌شود، اما چگونگی عملکرد لیتیم در تخمدان هنوز ناشناخته باقی مانده و نیازمند بررسی دقیق‌تر است. از طرف دیگر، به خوبی مشخص شده است که لیتیم بسیاری از اعمال خود را با مهار Glycogen synthetase Kinase-3 (GSK-3β)، مولکول کلیدی مسیر اصلی پیام‌رسانی Wnt انجام می‌دهد (۱۰). نکته جالب توجه این است که به نظر می‌رسد مسیر Wnt نقش مهمی در تکوین فولیکولی تخمدان بازی می‌کند چون بیان مولکول‌های مختلف این مسیر در تخمدان موش‌های صحرایی گزارش شده است و این امر خود، اهمیت بررسی دقیق مکانیسم اثر لیتیم را در تخمدان دو چندان می‌کند (۱۱)، بنابراین در این مطالعه، به منظور بررسی دقیق‌تر آثار سلولی و بافتی لیتیم بر تکوین فولیکول‌های تخمدان از موش‌های صحرایی نابالغ تحریک شده با گنادوتروپین به عنوان یک مدل مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که لیتیم باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال می‌شود. از این رو تعداد فولیکول‌های آنترتیک افزایش معنی‌دار و فولیکول‌های آنترال کاهش معنی‌داری می‌یابد که این امر نشان دهنده اثر لیتیم در کاهش تکوین فولیکولی است.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات مورد آزمایش و آماده‌سازی نمونه

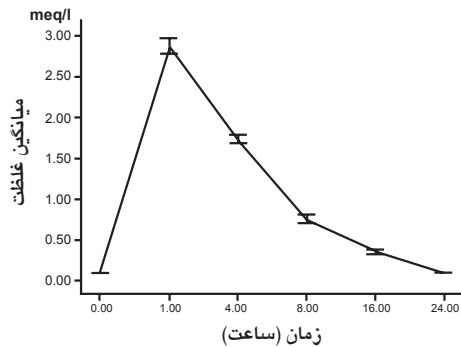
در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده نابالغ (۲۳ روزه، نژاد Wistar) از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد آب، غذا، نور (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) و درجه حرارت (۲۴-۲۲) نگهداری شدند. این طرح با تایید کمیته اخلاق زیستی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران صورت پذیرفت. موش‌ها در چهار گروه قرار داده شدند. گروه دست‌نخورده (هیچ تزریقی نداشتند)، گروه کنترل (تنها گنادوتروپین دریافت کردند)، گروه دارونما (علاوه بر گنادوتروپین، سرم فیزیولوژی را به عنوان حلال کلرید لیتیم دریافت کردند) و گروه آزمایش (علاوه بر گنادوتروپین، کلرید لیتیم را نیز دریافت کردند) (جدول ۱). تعداد حیوانات در هر گروه آزمایشی پنج و هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.

جدول ۱: گروه‌بندی حیوانات و تیمارهای انجام شده

گروه‌ها	PMSG	سرم فیزیولوژی	کلرید لیتیم ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
دست‌نخورده	-	-	-
کنترل	+	-	-
شم	+	+	-
تجربی	+	+	+

لیتیم (۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به ماکزیمم میزان خود (۲/۹ میلی اکی والان بر لیتر) و ۴ ساعت پس از تزریق این غلظت به نصف (۱/۶ میلی اکی والان بر لیتر) کاهش می یابد. ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، غلظت لیتیم به ترتیب به ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۱ میلی اکی والان بر لیتر کاهش می یابد. بدین ترتیب نتایج حاضر نشان می دهد که نیمه عمر لیتیم در خون ۴ ساعت می باشد. هم چنین ۲۴ ساعت پس از تزریق، غلظت لیتیم به ۰/۱ میلی اکی والان بر لیتر که مقدار طبیعی آن در خون است، کاهش می یابد. به عبارت دیگر ۲۴ ساعت پس از تزریق کلرید لیتیم، کل لیتیم تزریق شده از بدن خارج می شود. از آنجایی که لیتیم در سطح پلاسمایی ۰/۲ تا ۱/۵ میلی اکی والان بر لیتر برای درمان استفاده می شود، به منظور حفظ این سطح، موش های نابالغ هر ۱۲ ساعت از زمان تزریق PMSG40 دوز لیتیم را دریافت کردند.

به منظور بررسی اثر لیتیم بر تعداد فولیکول های تخمدانی، ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG تخمدان موش های گروه دست نخورده، کنترل، شم و تجربی، خارج و تعداد انواع فولیکول های تخمدانی مورد بررسی قرار گرفت. گروه بندی حیوانات و تیمارهای انجام شده در جدول ۱ آمده است.



نمودار ۱: نمودار غلظت لیتیم در ساعات های مختلف در خون رت بعد از تزریق کلرید لیتیم. ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید لیتیم به صورت داخل صفاقی به رت های (بالغ) تزریق و ۱، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق میزان لیتیم در سرم خون به روش Flame Photometry اندازه گیری شد. همان طور که مشاهده می شود غلظت لیتیم یک ساعت بعد از تزریق ماکزیمم و ۲۴ ساعت بعد از تزریق به حداقل (میزان طبیعی در خون) می رسد. داده ها  $n=7$  به صورت  $(Mean \pm SEM)$  هستند.

با PBS، به منظور رنگ آمیزی مضاعف هسته ها از مخلوط رنگ هوخست (Calbiochem) ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم روی برش ها استفاده شد و لام ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه نمونه کنترل مثبت، برش ها با مخلوط DNaseI به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد آنکوبه شدند و سپس مراحل فوق روی آنها انجام شد.

#### ب) استخراج DNA

برای مشخص شدن میزان قطعه قطعه شدن DNA در بافت تخمدان، از نمونه های فریز شده در  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد، استخراج DNA توسط کیت استخراج DNA (Trizma) صورت گرفت. به طور خلاصه هموزنی سبک بافت ها در بافر لیز کننده (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K)

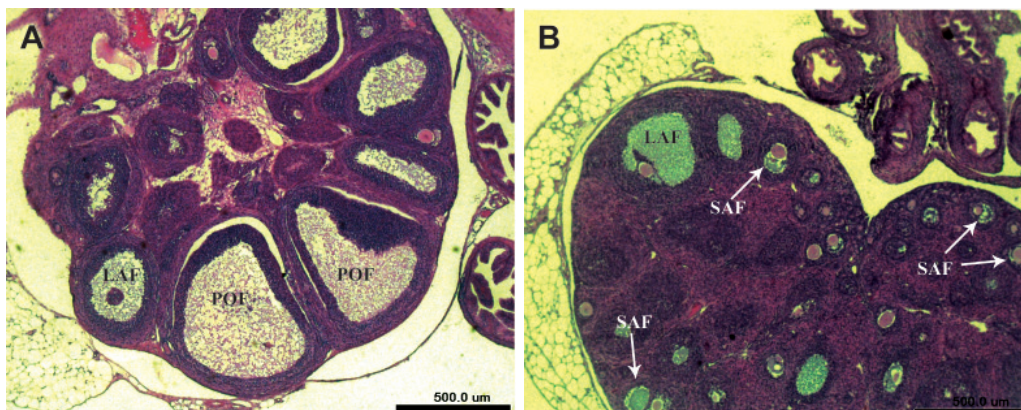
به مدت ۶ ساعت در دمای ۵۶ سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ rpm صورت گرفت. DNA توسط ایزوپروپانول رسوب، با الکل ۷۵ درصد شست و شو و در مرحله پایانی رسوب حاصله در ۲۰ ماکر و لیتر بافر TE حل شد. برای تعیین غلظت DNA، از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. بعد از تعیین غلظت، نمونه ها به میزان مساوی (۴۰ ماکروگرم)، روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و توسط UV رویت و عکس برداری شد.

#### آنالیز آماری

نتایج همه گروه های کنترل و تجربی با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز آماری شد. جهت بررسی تاثیر لیتیم بر تکوین فولیکول های تخمدانی و مقایسه تفاوت بین گروه ها از تست ANOVA استفاده شد. سطح معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد ( $p < 0.001$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.001$ ).

#### یافته ها

جهت تعیین نیمه عمر لیتیم، رت های ماده نابالغ با اثر بی هوش و خون گیری از قلب آنها صورت گرفت. همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود، غلظت لیتیم در خون، یک ساعت بعد از تزریق کلرید

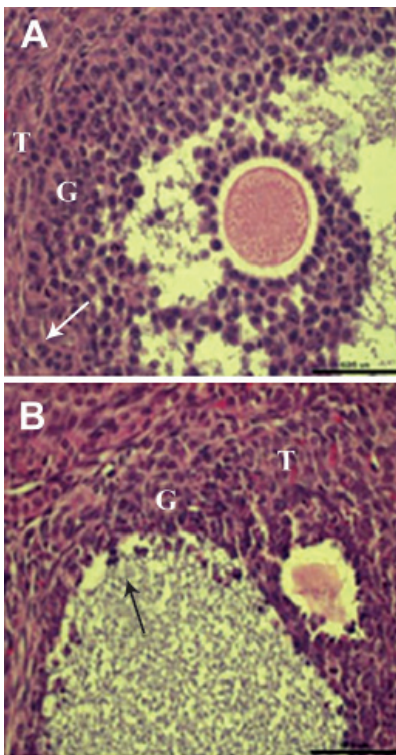


شکل ۱: فتومیکروگراف از تخمدان موش های گروه کنترل و تجربی ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG (رنگ آمیزی با H&E). موش های گروه تجربی ۴ دوز لیتیم (۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) را از زمان تزریق PMSG هر ۱۲ ساعت دریافت کردند. (A) تخمدان موش های گروه کنترل، همان طور که مشاهده می شود فولیکول های آنترال، اکثراً از نوع بزرگ (LAF، ۸۰۰-۶۰۰ میکرون) و بیش از تخمگذاری (POF، ۱۰۰-۸۰۰ میکرون) قابل مشاهده اند. (B) تخمدان موش های گروه تجربی، فولیکول های آنترال اکثراً از نوع کوچک (SAF، ۴۰۰-۲۰۰ میکرون) و متوسط (MAF، ۶۰۰-۴۰۰ میکرون) می باشد. مقیاس ۵۰۰ میکرون.

جدول ۲: میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال شمارش شده، ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG

گروه	دست نخورده	کنترل	شم	تجربی
۶۰۰ ± ۴۰۰ میکرون	۳/۵ ± ۰/۴۷۴۳	۱۰/۸ ± ۰/۵۸۳۱	۱۱ ± ۰/۷۰۵	۶/۲ ± ۱/۳۵۶
۸۰۰ ± ۶۰۰ میکرون	۰	۱۳ ± ۱/۲۲۵	۱۲/۸۹ ± ۰/۹۸۵	۴/۴ ± ۰/۵۰۹۹
۱۰۰۰ ± ۸۰۰ میکرون	۰	۵/۴ ± ۰/۶۷۸	۵/۱ ± ۰/۵۳۲	۰

رنگ آمیزی شده با H&E، مرگ سلولی با مشاهده هسته‌های پیکنوتیک و کروماتین متراکم در حاشیه، قابل تشخیص بود. فولیکول‌های آترتیک را نیز می‌توان با مشاهده هسته‌های پیکنوتیک فراوان در لایه گرانولوزا، کاهش ضخامت و عدم سازماندهی سلولی این لایه و اوسیت چروکیده تشخیص داد. اگر چه این علائم در فولیکول‌های آنترال تخمدان موش‌های گروه کنترل به ندرت مشاهده شد (شکل ۲A).

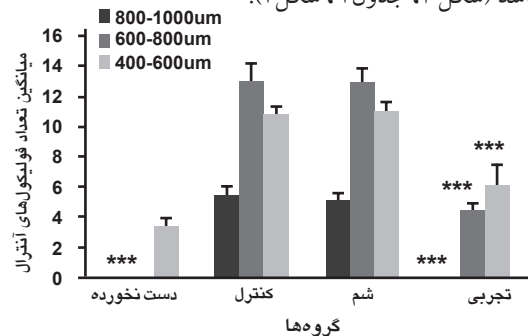


شکل ۲: فتومیکروگراف از تخمدان موش‌های کنترل و تیمار ۴۸ ساعت پس از PMSG (رنگ آمیزی با H&E). موش‌های گروه تجربی ۴ دوز لیتیم (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را هر ۱۲ ساعت یک بار دریافت کردند. (A) فولیکول آنترال تخمدان موش‌های گروه کنترل، فلش نشان دهنده هسته در حال تکثیر می‌باشد. (B) فولیکول آنترال تخمدان موش‌های گروه تجربی، عدم سازماندهی سلولی در لایه سلول‌های گرانولوزا (G) و تک (T) مشهود است. فلش نشان دهنده اجسام آپونوتیک در حاشیه حفره آنتروم می‌باشد (مقیاس‌ها: ۶۲/۵ میکرون).

ولی در نمونه‌های گروه تجربی، هسته‌های پیکنوتیک و اجسام کروی شکل (Apoptotic Bodies) فراوان در لایه سلول‌های گرانولوزا به خصوص در حاشیه حفره آنتروم مشاهده گردید (شکل ۲B). هم چنین شمارش تعداد فولیکول‌های آترتیک نشان داد که درصد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه تجربی (۵۹/۴ درصد) افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل (۶/۲ درصد) نشان می‌دهد (نمودار ۳).

نتایج نشان داد که لیتیم، تغییر معنی داری در تعداد فولیکول‌های پراآنترال و آنترال کوچک (۴۰۰ ± ۲۰۰ میکرون) نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرده است (داده‌ها ارایه نشده است). تعداد این فولیکول‌ها در گروه کنترل نسبت به گروه دست نخورده نیز تغییر معنی داری را نشان نمی‌داد. ولی لیتیم باعث کاهش معنی دار ( $p < 0/0001$ ) تعداد فولیکول‌های آنترال متوسط (۶۰۰ ± ۴۰۰ میکرون) و بزرگ (۸۰۰ ± ۶۰۰ میکرون) (به ترتیب ۶/۲ ± ۱/۳۵۶ و ۴/۴ ± ۰/۵۰۹ میکرون) نسبت به گروه کنترل (به ترتیب ۱۰/۸ ± ۰/۵۸۳۱ و ۱۳ ± ۱/۲۲۵ میکرون) و عدم تشکیل فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری (۸۰۰ ± ۱۰۰۰ میکرون) (در کنترل ۵/۴ ± ۰/۶۷۸۲ میکرون) شده است (جدول ۲، شکل ۲).

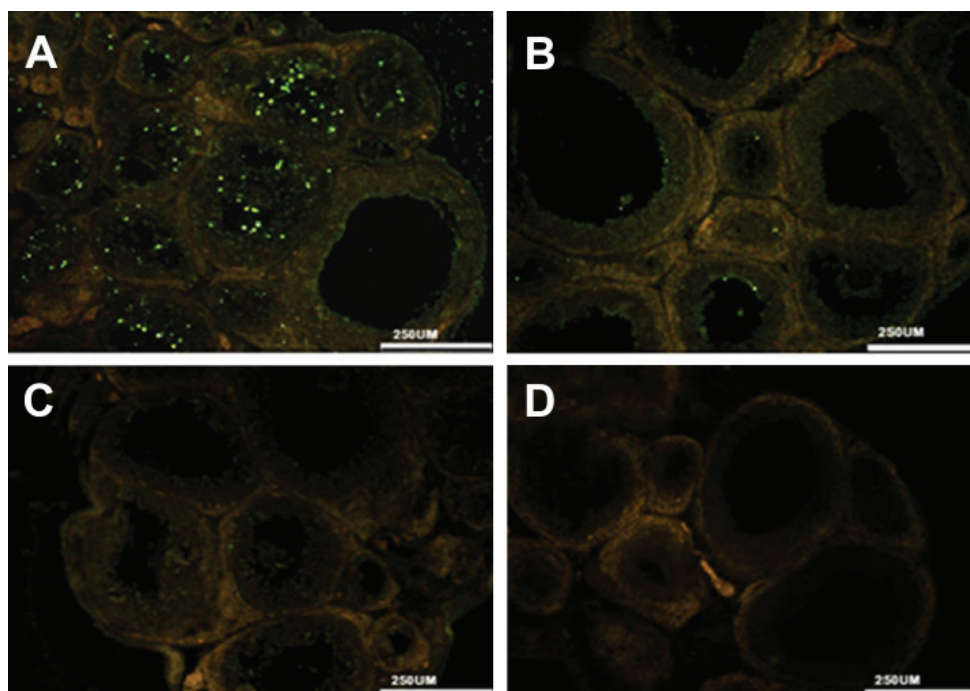
همان طور که انتظار می‌رفت، تعداد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه کنترل نسبت به گروه دست نخورده (به ترتیب ۳/۵ ± ۰/۴۷۴ و ۰ میکرون) افزایش معنی داری ( $p < 0/0001$ ) داشت که نشان دهنده تاثیر مثبت گنادوتروپین (PMSG) در تحریک تخمدان می‌باشد (شکل ۱، جدول ۲، شکل ۲).



نمودار ۲: تعداد فولیکول‌های آنترال شمارش شده در تخمدان گروه‌های مختلف تجربی، کنترل، شم و دست نخورده. تعداد فولیکول‌های با سایز ۶۰۰-۸۰۰، ۸۰۰-۱۰۰۰ و ۱۰۰۰-۱۲۰۰ میکرون در تخمدان گروه تجربی کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل یافته است، این تعداد در گروه کنترل نسبت به گروه دست نخورده افزایش معنی داری را نشان می‌دهد. تعداد انواع فولیکول‌های آنترال در تخمدان موش‌های گروه شم تفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهند. داده‌ها نمایانگر هستند ( $p < 0/05$ ,  $n=5$ ).

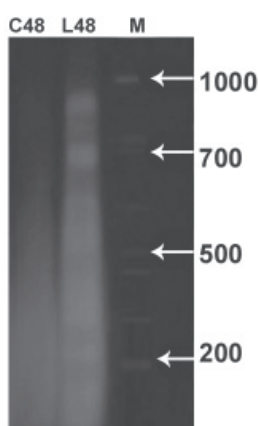
بررسی تعداد انواع این فولیکول‌ها در تخمدان رت‌های گروه شم (به ترتیب ۱۱ ± ۰/۷۰۵، ۱۲/۸۹ ± ۰/۹۸۵ و ۵/۱ ± ۰/۵۳۲ میکرون) نشان داد که این تعداد تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) را نسبت به گروه کنترل نداشت که نشان دهنده عدم تاثیر گذاری روش کار در نتایج به دست آمده است. به همین دلیل طی بررسی‌های دقیق تر سلولی و مولکولی بعدی از بررسی این گروه، صرف نظر شد.

جهت بررسی علل کاهش مشاهده شده در تعداد فولیکول‌های آنترال در پی تزریق کلرید لیتیم، مرگ سلولی در مقاطع رنگ آمیزی شده با H&E و TUNEL مورد بررسی قرار گرفت. در مقاطع

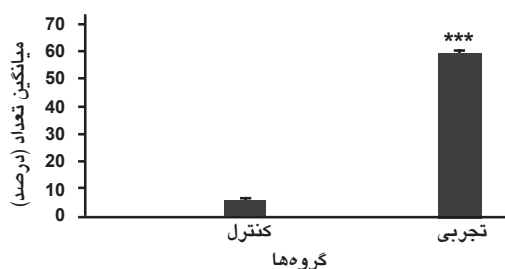


شکل ۳: فتومیکروگراف از تخمدان موش‌های گروه دست نخورده، کنترل و تجربی، ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG رنگ‌آمیزی شده با استفاده از تکنیک TUNEL. (A) تخمدان گروه تجربی، (B) تخمدان گروه کنترل، (C) کنترل منفی، (D) تخمدان گروه دست نخورده. تعداد سلولهای TUNEL مثبت در تخمدان موش‌های گروه تجربی افزایش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل یافته است (مقیاس: ۲۵۰ میکرون).

اندازه متوسط تا بزرگ شده است. به منظور تایید مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس و نه نکروزیس، آنالیز الکتروفورتیک DNA (با وزن مولکولی پایین) صورت گرفت. در بررسی DNA استخراج شده از تخمدان موش‌های گروه کنترل و تجربی، الگوی قطعه قطعه شدن DNA تنها در نمونه‌های تجربی و نه کنترل، مشاهده شد. باندهای سبک ایجاد شده در نمونه‌های گروه تجربی در محدوده وزنی ۱۰۰۰-۲۰۰۰ bp بودند (شکل ۴).



شکل ۴: الگوی قطعه قطعه شدن DNA (laddering) استخراج شده از تخمدان موش‌های گروه تجربی و کنترل ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. همان طور که در ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید دیده می‌شود، قطعه قطعه شدن DNA تنها در نمونه‌های تجربی رخ داده است. M، مارکر (۱۰۰ bp)، C48، نمونه کنترل و L48، نمونه تجربی را نشان می‌دهند.



نمودار ۳: تعداد فولیکول‌های آترتیک شمارش شده در تخمدان گروه‌های تجربی و کنترل ۴۸ ساعت پس از تزریق PMSG. تعداد فولیکول‌های آترتیک در تخمدان گروه تجربی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل یافته است. داده‌ها نمایانگر (Mean±SEM) هستند ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

بررسی مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با تکنیک TUNEL، وجود آپوپتوزیس را تایید کرد. بر خلاف وجود تعداد کم سلول‌های گرانولوزای TUNEL مثبت (۵ درصد) در تعداد اندکی از فولیکول‌های آنترال گروه کنترل (شکل ۳B)، این تعداد در تخمدان موش‌های گروه تجربی (۵۶ درصد)، به مراتب بیشتر بوده و در تعداد بیشتری از فولیکول‌های آنترال حضور داشته است (شکل ۳A). مرگ سلولی (آپوپتوزیس)، بیشتر در سلول‌های گرانولوزا ولی به طور پراکنده در سلول‌های تک نیز هسته‌های TUNEL مثبت قابل مشاهده بود. همچنین بیشتر سلول‌ها در تخمدان‌های گروه دست نخورده و هسته‌های اووسیت در تمامی گروه‌های مورد بررسی، TUNEL منفی بودند. در مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهند که کلرید لیتیم، موجب افزایش مرگ سلولی (به احتمال از نوع آپوپتوزیس) به خصوص در فولیکول‌های آنترال به

عمل می کند و باعث حفاظت نورون‌ها مقابل آپوپتوزیس می‌شود (۱۶)، شواهدی دیگر لیتیم را به عنوان القا کننده آپوپتوزیس معرفی کرده است. ژانگ و همکارانش نشان دادند که LiCl بسته به نوع سلول، می‌تواند منجر به افزایش تکثیر یا توقف در چرخه سلولی و آپوپتوز در سلول‌های پستانداران شود. هم‌چنین گزارش شده است که لیتیم، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های گرانوله مغزی در رت‌های نابالغ می‌شود (۱۷). تیلی و همکارانش نیز قطعه شدن DNA را در فولیکول‌های آترتیک تخمدان نشان دادند (۱۸). در مجموع عملکرد متضاد و دوگانه آنتی‌آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک لیتیم را می‌توان به پاسخ‌دهی متفاوت سلول‌های مختلف به لیتیم نسبت داد (۱۸). گزارشات متعددی بیانگر رقابت شدید لیتیم با کاتین‌هایی از قبیل سدیم، منیزیم، کلسیم و مهار عملکردهای وابسته به این یون‌ها است (۱۹، ۲۰). با توجه به اینکه این کاتین‌ها به عنوان کوفاکتورهای آنزیم‌های سنتزکننده DNA نظیر DNA پلیمراز و توپوایزومراز I، II عمل می‌کند (۱۹)، می‌توان به این جمع‌بندی رسید که لیتیم می‌تواند با اختلال در سنتز و همانندسازی DNA، منجر به توقف تقسیم سلولی و مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس شود.

هم‌چنین نقش لیتیم در آپوپتوزیس را می‌توان به واسطه عملکردی که در مهار GSK-3 $\beta$  (۲۱)، مولکول کلیدی مسیر انتقال پیام داخل سلولی Wnt دارد توجه کرد. در مسیر پیام‌رسانی Wnt، آنزیم GSK-3 $\beta$  مهار و غیرفعال شده و در نهایت ژن‌های هدفی بیان می‌شود که نقش مهمی در کنترل تمایز، تکثیر و آپوپتوزیس سلول‌های قبل و بعد از تولد دارند. علاوه بر اهمیت مسیر Wnt در تکوین اندام تناسلی ماده (به خصوص گنادهای جنسی) (۱۱)، بیان مولکول‌های مختلف مسیر Wnt نیز در مراحل مختلف تکوین فولیکولی، تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد گزارش شده است (۱۱، ۱۲). به این ترتیب لیتیم به عنوان مهار کننده GSK-3 $\beta$  و از طریق فعال کردن مسیر اصلی Wnt می‌تواند تکوین فولیکولی را تحت تاثیر قرار دهد. در همین رابطه، مدونجانین و همکارانش (۲۳) در این اواخر نشان دادند که لیتیم با مهار GSK-3 $\beta$  موجب غیرفعال‌سازی رسپتور استروژنی آلفا و مانع از عملکرد استروژن و اختلال در عملکرد فولیکول‌های تخمدانی می‌شود.

### نتیجه‌گیری

از نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان چنین نتیجه گرفت که به احتمال کلرید لیتیم با القای آپوپتوزیس در سلول‌های گرانولوزا موجب افزایش فولیکول‌های آترتیک و در نتیجه مانع از پیشرفت تکوین فولیکولی و کاهش تعداد فولیکول‌های آنترال می‌شود. از آنجا که لیتیم توانایی تقلید مسیر اصلی سیگنال‌دهی Wnt را دارد، در پژوهش‌های آینده، فعالیت و بیان اجزای این مسیر به خصوص GSK-3 $\beta$  در تخمدان موش‌های تیمار شده با کلرید لیتیم مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

### تقدیر و تشکر

از کارشناس آزمایشگاه سلولی - تکوینی سرکار خانم شیخ‌پور و آقای دکتر شاهرخ صفریان به خاطر راهنمایی‌هایشان نهایت تشکر را داریم. این طرح با کمک و حمایت مالی پردیس علوم دانشگاه تهران انجام گرفت.

از آنجا که فراگمته شدن DNA از شاخص‌های آپوپتوزیس است، این مشاهدات موید اثر کلرید لیتیم در القای آپوپتوز و نه نکروز می‌باشد.

### بحث

تاکنون یافته‌های محققین نشان داده است که لیتیم، دارویی موثر در درمان بیماری دو قطبی است اما باعث اختلال در تکوین فولیکولی و کاهش فولیکول‌زن نیز می‌شود (۹). با توجه به فقدان شواهد کافی و ابهام در چگونگی اثر لیتیم در کاهش فولیکول‌زن، در این پژوهش با استفاده از مدل موش‌های نابالغ تحریک شده با گنادوتروپین، چگونگی اثر لیتیم در تکوین فولیکولی بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که لیتیم در سطح بافتی، باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آنترال متوسط، بزرگ و پیش از تخمک‌گذاری و افزایش فولیکول‌های آترتیک می‌شود و در سطح سلولی، آپوپتوزیس را در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال افزایش می‌دهد. نتایج حاصله از مطالعات بافتی بیانگر کاهش در تعداد فولیکول‌های آنترال متوسط (۶۰۰-۴۰۰ میکرون) و بزرگ (۸۰۰-۶۰۰ میکرون) و عدم تشکیل فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری (۱۰۰۰-۸۰۰ میکرون) است که موید کاهش در فولیکول‌زن توسط لیتیم است. این نتایج موافق با نتایج سایر محققین (۶، ۹) می‌باشد. بررسی‌های بیشتر مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با روش هماتوکسیلین-اؤزین نشان داد که هسته‌های متراکم پیکنوتیک و اجسام آپوپتوتیک فراوانی در تعداد زیادی از فولیکول‌های آنترال تخمدان موش‌های تیمار شده با کلرید لیتیم وجود دارند. به علاوه در این فولیکول‌ها تغییرات مورفولوژیکی از قبیل عدم سازماندهی سلول‌های لایه‌های گرانولوزا و تک مشاهده شد. این مشخصه‌ها که همگی به عنوان علائم فولیکول‌های آترتیک (۴، ۱۵) شناخته می‌شوند، در تخمدان موش‌های گروه تجربی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از تخمدان موش‌های گروه کنترل مشاهده گردید. در واقع نتایج فوق نشان می‌دهد که فولیکول‌های آنترال بیشتری تحت تاثیر کلرید لیتیم وارد روند آترزی شده‌اند. به این ترتیب می‌توان گفت که یکی از عوامل کاهش دهنده تعداد فولیکول‌های آنترال، افزایش مرگ سلولی در سلول‌های گرانولوزا و در واقع شروع روند آترزی در این فولیکول‌ها است.

به منظور تایید نتایج هیستولوژیک و بررسی دقیق‌تر احتمال وقوع آپوپتوزیس، مقاطع بافتی با تکنیک TUNEL رنگ‌آمیزی و مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها نشان داد که در تخمدان موش‌های گروه آزمایش تعداد سلول‌های گرانولوزای TUNEL مثبت در فولیکول‌های آنترال متوسط و بزرگ نسبت به گروه کنترل به شدت افزایش یافته بود. در بررسی DNA بافت تخمدانی نیز الگوی قطعه قطعه شدن (laddering) تنها در موش‌های تیمار شده با لیتیم و نه در نمونه‌های کنترل مشاهده شد. در مجموع، نتایج نشان می‌دهند که لیتیم با القای آپوپتوزیس در فولیکول‌های آنترال متوسط تا بزرگ موجب شروع روند آترزی در این فولیکول‌ها گردیده و مانع رسیدن فولیکول‌ها به مرحله پیش از تخمک‌گذاری شده است.

اگرچه شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد لیتیم به عنوان یک عامل آنتی‌آپوپتوتیک به خصوص در مورد نورون‌ها

## References

1. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991; 124: 43-101.
2. Cannon JD, Cherian-Shaw M, Lovekamp-Swan T, Chaffin CL. Granulosa cell expression of G1/S phase cyclins and cyclin-dependent kinases in PMSG-induced follicle growth. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 264(1-2): 6-15.
3. Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids.* 2003; 68(10-13): 861-867.
4. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004; 82 E-Suppl: E40-52.
5. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *J Endocrinol.* 2006; 189(3): 441-453.
6. Jana D, Nandi D, Maiti RK, Ghosh D. Effect of human chorionic coadministration on the activities of ovarian, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and ovarian and uterine histology in lithium chloride-treated albino rats. *Reprod Toxicol.* 2001; 15(2): 215-219.
7. Sheikhah SH, Collins TJ, Rassoli AH, LeGate LS, Banerji TK. Effects of lithium on the pituitary-gonadal axis in the rat: evidence for dose-dependent changes in plasma gonadotropin and testosterone levels. *Life Sci.* 1987; 40(18): 1835-1844.
8. Ghosh PK, Biswas NM, Ghosh D. Effect of lithium chloride on testicular steroidogenesis and gametogenesis in immature male rats. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 1991; 124(1): 76-82.
9. Ghosh D, Biswas NM. Effect of lithium chloride on the activities of ovarian delta 5-3 beta and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase and histology of ovary in albino rats. *Medical Science Research.* 1991; 19: 703-704.
10. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(19): 6990-6995.
11. Ricken A, Lochhead P, Kontogiannea M, Farookhi R. Wnt signaling in the ovary: Identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology.* 2002; 143(7): 2741-2749.
12. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57: 195-220.
13. Bedaiwy MA, Hussein MR. Histological evaluation and in situ localization of apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East Fertility Society Journal.* 2004; 9(2): 163-170.
14. Muskhelishvili L, Wingard SK, Latendresse JR. Proliferating cell nuclear antigen--a marker for ovarian follicle counts. *Toxicol Pathol.* 2005; 33(3): 365-368.
15. Tabarowski Z, Szołtys M, Bik M, Słomczyńska M. Atresia of large ovarian follicles of the rat. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005; 43(1): 43-50.
16. Li X, Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord.* 2002; 4(2): 137-144.
17. Zhang WV, Jullig M, Connolly AR, Stott NS. Early gene response in lithium chloride induced apoptosis. *Apoptosis.* 2005; 10(1): 75-90.
18. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1991; 129(5): 2799-2801.
19. Oliveira AG, Soares MJ, Pinto AS. Ultrastructural alterations induced by lithium chloride in DNA-containing organelles of a bat trypanosome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(4): 513-516.
20. Laurenz JC, Smith SB. Lithium chloride does not inhibit the proliferation of L6 myoblasts by decreasing intracellular free inositol. *J Anim Sci.* 1998; 76(1): 66-73.
21. Jope RS. Inhibition of glycogen synthase kinase-3: a potential therapeutic target of lithium. *Clinical Neuroscience Research.* 2004; 4: 171-179.
22. Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in Pharmaceutical Sciences.* 2003; 24: 441-443.
23. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem.* 2005; 280(38): 33006-33014.