بررسی میزان گیرنده‌های IGF-I و انسولین در سلول‌های گرانولوزا و تکا به روش ایمونوهیستوشیمی

بهـاره اعتصـام*، حمیدرضا رحمانی، محمد خوروش، سعید انصاری مهیاری و سید حمید زرکش اصفهانی
دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
* نویسنده مسئول: بهاره اعتصام bahareetesam@gmail.com.
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، کدپستی ۸۳۱۱۱-۸٤۱٥٦ ، اصفهان ، ایران

چکیده:

در این مطالعه، ما به بررسی و مقایسه این گیرنده‌ها در سلول‌های تخمدان گاوهای بارور و نابارور، با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی می‌پردازیم. در این آزمایش، ۳۰ عدد تخمدان گاو شیری از کشتارگاه‌های متعددی جمع آوری شده که ۲۰ عدد از آنها مربوط به گاوهای نابارور و ۱۰ عدد متعلق به گاوهای بارور در دامنه سنی ۲ تا ۷ سال بودند. تخمـــدان‌ها در فرمـالین فیکس شده و رنگ آمیزی H&E و ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی منوکلونال خرگوشی، روی نمونه‌ها انجام گردید. نتایج مطابق سیستم اسکوربندی هشت واحدی Allred و براساس شدت و وسعت رنگ آمیزی تفسیر شده است. این نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری هم به لحاظ شدت رنگ پذیری و هم از نظر وسعت رنگ پذیری بین میزان گیرنده‌ها در بافت تخمدان گاوهای بارور و نابارور می‌باشد ($p < ۰/۰۰۰۱$). وسعت رنگ آمیزی در سلول‌های تکا به مراتب بیشتر از سلول‌های گرانولوزا بود. در پایان می‌توان نتیجه گرفت حضور گیرنده هورمون‌های انسولین و IGF-I در سلول‌های تخمدان بیانگر تأثیر شرایط متابولیکی دام بر عملکرد تخمدان است؛ بنابراین میزان گیـرنده‌های موجود از این هورمون‌ها در بافت تخمـدان و اطراف اووسیت یکی از شـاخص‌های باروری و ناباروری به شمار می‌آید.

کلید واژه: گاو شیری، انسولین، IGF-I ، گیرنده انسولین و IGF-I ، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه:

حذف یک گاو می‌تواند به دلایل مختلف مثل سن، مرحله شیردهی، تولید، وضعیت سلامتی، توان تولید مثل و عوامل اقتصادی باشد. بیشترین درصد حذف در گاوداری‌های صنعتی مربوط به عدم باروری و مشکلات تولید مثلی گزارش شده است. یکی از علل آسیب‌های بافت تخمدانی، بالانس منفی انرژی می‌باشـد و در این ارتباط گیرنـده‌های IGF و انسولیـن به عنوان شاخص‌های بافتی در معرض خطرند. انسولین، هورمونی است که اثر خود را بر تولید مثل هم به صورت مستقیم و هم غیر مستقیم اعمال می‌کند. انسولین اثر خود را از طریق گیرنده‌های غشایی اعمال می‌کند. گیرنده انسولین از نوع تیروزین کینازی است. گیرنده‌های انسولین در انواع سلولهای تخمدانی وجود دارد. سلولهای گرانولوزا، تیکا، جسم زرد و سلولهای پوششی سطح تخمدان دارای این گیرنده‌ها هستند[۱]. IGF نیز یک هورمون آنابولیک قوی است که عمدتاً توسط کبد و همچنیـن سایـر بافت‌های محیطی با تحـریک هورمون رشد آزاد می‌شود و مسئول بسیاری از اثرات آنابولیک هورمون رشد می‌باشد. این هورمون نیز به مانند انسولین هم به صورت اندوکرین و هم اتوکرین در فعالیت تولیدمثلی دخالت دارد.گیرنده-های این هورمون نیز مانند گیرنده‌های انسولین در سطح سلولهای مختلف تخمدان قابل مشاهده هستند[٤]. بنا بر آنچه گفته شد مشاهده و تخمین تعداد گیرنده‌های IGF و انسولین توسط روش‌هایی مانند ایمونوهیستوشیمی می‌تواند به اهمیت نقش این دو هورمون در تولید مثل کمک کند.

مواد و روشها

در پژوهش حاضر، هر دو تخمدان گاو هلشتاین بلافاصله بعد از کشتار از کشتارگاه‌های محلی جمع آوری گردید. گاوها در دامنه سنی ۲ تا ۷ سال بودند. ۳۰ جفت تخمدان جمع آوری شد که ۲۰ جفت مربوط به گاوهای نابارور و ۱۰ جفت

مربوط به گاوهای بارور بودند. تخمدان‌های جمع آوری شده، اعم از فعال یا غیر فعال، پس از انتقال به آزمایشگاه، در اندازه-های ۲-۳ میلیمتر برش داده شد. سپس از هر نمونه، بلوک‌های پارافینی مناسب جهت بررسی ایمونوهیستوشیمی، تهیه شدند. این بلوک‌ها جهت رنگ آمیزی H&E و ایمونوهیستوشیمی به قطر ۳-٤ میکرومتر برش مجدد خورده و بر روی لام پلی لایزین قرار گرفتند.

در این تحقیق، ایمونوهیستوشیمی با روش Envision انجام شد. در پایان تفسیر نمونه‌های رنگ آمیزی شده با IGF-I توسط اسکوربندی هشت واحدی Allred انجام شد[۳]. آنتی بادی به کار رفته یک آنتی بادی منوکلونال خرگوشی برای گیرنده IGF-I است که با گیرنده انسولین و پروتئین‌های مرتبط با گیرنده انسولین واکنش متقابل دارد.

سیستم اسکور بندی هشت واحدی Allred :

این سیستم براساس شدت و وسعت رنگ آمیزی به این صورت تفسیر می‌گردد:

شدت رنگ‌پذیری از صفر تا ۳ به‌صورت: صفر (0)، ضعیف (1)، متوسط (2)، شدید (3).

وسعت رنگ پذیری از صفر تا ۵ که بر مطابق جدول زیر از ضعیف تا عالی را در یر می‌گیرد:

Proportion Score	$< \frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$ تا $\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$ تا $\frac{2}{3}$	$\frac{1}{3}$ تا $\frac{2}{3}$	$< \frac{1}{3}$
وسعت رنگ پذیری	درجه ۱ (ضعیف)	درجه ۲	درجه ۳	درجه ٤	درجه ۵ (عالی)

نتایج

در مطالعه‌ای که توسط ژو و همکاران در سال ۱۹۹۱ انجام شد، سطوح بالای IGF-I و بیان ژن گیرنده آن در سلول‌های گرانولوزا و فولیکول‌های در حال رشد نشان می‌دهد که IGF-I در سلول‌های گرانولوزا نقش مهمی در تکامل و رشد اووسیت و فولیکول دارند[۵]. در مطالعه الروی و همکاران (۱۹۹۳) mRNA گیرنده انسولین به طور گسترده‌ای در تمامی انواع سلول‌های تخمدان تشخیص داده شده است[۲]. نتایج مطالعه بوسارت و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد تراکم گیرنده انسولین در فولیکول‌های کوچک بیشتر از فولیکول‌های بزرگ و غالب است[۱].

با توجه یافته های این تحقیق، هم برای شدت رنگ آمیزی و هم برای وسعت رنگ آمیزی، از لحاظ آماری اختلاف معنی داری میان گاوهای بارور و نابارور وجود دارد. شدت رنگ آمیزی بطور قابل توجهی در سلول‌های گرانولوزا در مقایسه با تکا بالا بود، ولی از آنجاییکه سلول‌های تکا فضای بیشتری از نظر ابعادی از فولیکول را اشغال می‌کنند، لذا کمربند سلول‌های تکا اگرچه کمرنگ‌تر به نظر می‌رسد، ولی حجم و تراکم بیشتری را به خود اختصاص داده است؛ به همین جهت وسعت رنگ آمیزی در سلول‌های تکا بیشتر است. شدت رنگ آمیزی در سلول‌های گرانولوزا در ناحیه خارجی سلول‌ها و بیشتر نزدیک غشاء پایه متمرکز است که بازتاب حضور گیرنده‌ها را در این ناحیه مشخص می‌کند. فاصله نسبتاً کم رنگ و یا بی رنگی (Pale) که در بین سلول‌های گرانولوزا و تکا قابل مشاهده است، حاکی از عدم حضور فعالیت آنتی بادی مربوطه در این زمینه می‌باشد. نتایج این مطالعه در جدول‌های ۱-۱ و ۱-۲ و شکل‌های مترادف ۱-۱ و ۱-۲ به شرح ذیل ذکر شده است:

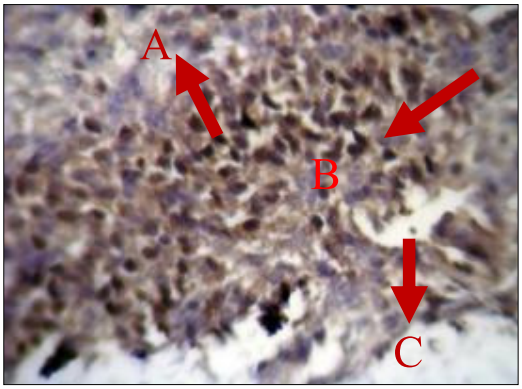
جدول ۱-۱. میزان گیرنده‌های IGF-I و انسولین در سلول‌های گرانولوزای گاوهای بارور و نابارور و مقایسه دانسیتومتری تراکم رنگ

وضعیت رنگ آمیزی	گاوهای بارور n=۱۰	گاوهای نابارور n=۲۰	P value
شدت رنگ آمیزی	۳/۰۰±۰/۱۳	۱/۵۸±۰/۰۹۵	۰/۰۰۰۱

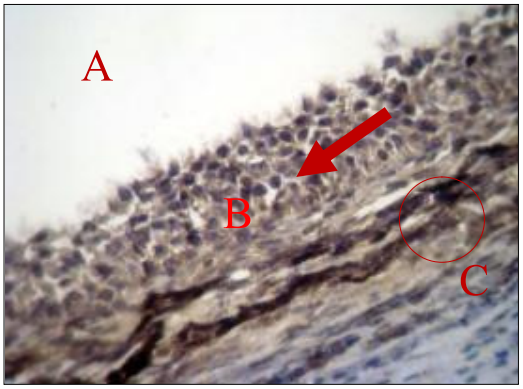
وسعت رنگ آمیزی	٤/٦±٠/٣٥	٢/٧±٠/٢٦	٠/٠٠٠١

جدول ۱-۲. میزان گیـرنده‌های IGF-I و انسولین در سلول‌های تکای گاوهای بارور و نابارور و مقایسه دانسیتومتری تراکم رنگ

وضعیـت رنگ آمیـــزی	گـاوهای بارور n=۱۰	گـاوهای نابارور n=۲۰	P value
شدت رنگ آمیزی	٢/٦±٠/١٦	١/٥٧±٠/١٢	٠/٠٠٠١
وسعت رنگ آمیزی	٤/٤±٠/٣٨	٢/٤٧±٠/٢٨	٠/٠٠٠١



شکل ۱-۱. (بزرگنمایی : ×٤٠٠) تراکم پذیری و رنگ پذیری سلول‌های گرانولوزا با روش IHC و آنتی بادی منوکلونال
A : آنتروم، B : سلول گرانولوزا، C : استرومای بین سلول‌های تکا و سلول‌های گرانولوزا



شکل ۱-۲. (بزرگنمایی : ×۲۰۰) سلول‌های تکا با تراکم رنگ پذیری بیشتری و وجود آنها در قطر بیرونی فولیکول A آنتروم مجموعاً گیرنده بالاتری را به خود اختصاص می‌دهند.
A : آنتروم، B : سلول گرانولوزا، C : سلول تکا

نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش معنی دار میزان پراکندگی و تراکم گیرنده‌های IGF-I و انسولین درسلول‌های گرانولوزا و تکا و نیز افزایش گیرنده‌ها در سلول‌های تخمدانی گاوهای بارور در مقایسه با گاوهای نابارور به طور کامل با نتیجه مطالعات ژو و همکاران (۱۹۹۱)، الروی و همکاران (۱۹۹۳) و بوسارت و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت.

منابع

[1] Bossaert P., De Cock H., Leroy J.L.M.R., De Campeneere S., Bols P.E.J., Filliers M. and Opsomer G., “Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo”, The Journal of Theriogenology, No.73, pp.1210–1219, 2010.
[2] el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT Jr and Yen SS., “Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary.”, The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism, vol. 77, No. 5, pp. 1411-1418, 1993.
[3] Mohammadi Sichani M., Sarreshtedar Yazdi F., Afshar Moghaddam N., Chehrei A., Kabiri M., Naeimi A., Taheri D., “Prognostic value of insulin-like growth factor-I receptor expression in renal cell in Carcinoma.”, Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation., vol. 21, No. 1, pp. 69-74, 2010.

[4] Perks C.M., Peters A.R. and Wathes D.C., "Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in bovine ovary", The Journal of Reproduction and Fertility., No.116, pp. 157-165, 1999.
[5] Zhou J.,Chin E. and Bondy C., "Cellular Pattern of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-I Receptor Gene Expression in the Developing and Mature Ovarian Follicle" , The Journal of Endocrinology, vol. 129, No. 6, pp. 3281-3288, 1991.

Immunohistochemical Study on the IGF-I and Insulin Receptors Density in Granulosa and Theca Cells

B. Etesam*, H.R. Rahmani, M. Khorvash, S. Ansari Mahyari, H. Zarkesh Esfahani
* Corresponding E-mail address: bahareetesam@gmail.com
Department of Animal Sciences, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
Postal Code: Isfahan, 84156-83111, Iran

Abstract:
Here, we studied and compared the density of these receptors in ovary cells of fertile and non-fertile cattle via immunohistochemical technique. In this study, 30 ovaries of dairy cattle (20 ovaries from non-fertile, 10 ovaries from fertile) were collected from several slaughterhouses aging 2-7 years old. The ovaries have been fixed with formalin, then the samples were stained in immunohistochemical and H&E method. Based on the intensity and expanse of staining method, the results have been expounded in the Allred 8-units scored system. The results revealed considerable statistical differences both in intensity and expanse of staining in density of receptors in ovary tissues of fertile and non-fertile dairy cattle ($p < 0.0001$). Staining expanse was notably higher in theca cells than granulosa cells. Finally, we can conclude that the presence of the receptors of Insulin and IGF-I hormones in ovarian cells demonstrates the effect of metabolic conditions of cattles on ovary activities; so the density of these hormone receptors in ovarian tissue and around oocyt could be consider as one of fertile or non-fertile indices.
Keywords: Dairy cattle, Insulin, IGF-I, Insulin and IGF-I receptors, Immunohistochemistry.