

## ارزیابی فرآیند تکثیر سلولی فولیکولهای تخمدان با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی PCNA در رت های هیپوتیروئید

محمود مقدم درافشانی\*، دکتر محمدرضا نیکروش\*\*، دکتر مهدی جلالی\*\*، دکتر علیرضا ابراهیم زاده\*\*\*

دریافت: ۹۰/۱۱/۱۶، پذیرش: ۹۱/۴/۱۳

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** عملکرد تناسلی طبیعی در زنان، نیازمند پیام های هورمونی هیپوتالاموسی، هیپوفیزی و تخمدانی است. کاهش تولید و ترشح هورمون های تیروئیدی مشخصه هیپوتیروئیدی اولیه می باشد. طی مراحل رشد فولیکولار، کمپلکس PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) و سیکلین D نقش مهمی در تنظیم فرآیند تکثیر سلولی در فولیکولهای تخمدان ایفا می کند. هدف از این مطالعه تعیین شاخص تکثیر سلولی ناشی از کاهش هورمونهای تیروئیدی و چگونگی تغییرات این فرآیند در فولیکولهای تخمدان رت می باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی تعداد ۲۰ سرموش صحرانی ماده نژاد ویستار به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. گروه تجربی با استفاده از داروی پروپیل تیواوراسیل (PTU) به میزان ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آب آشامیدنی تیروئید کتومی شیمیایی شدند. گروه کنترل فقط آب آشامیدنی معمولی دریافت کردند. پس از گذشت سه هفته رت ها قربانی شدند و تخمدانهای آنها پس از تشریح برای آماده سازی بافتی فیکس گردید. جهت تعیین شاخص تکثیر سلولی از تکنیک ایمونوهیستوشیمی PCNA و برای شمارش سلول ها از روش استرئولوژیک استفاده شد.

**نتایج:** ایندکس تکثیر سلولی به تناوب رشد فولیکولار از فولیکول Preantral تا فولیکول Graafian کاهش معنی داری را در گروه هیپوتیروئید نشان داد ( $P < 0.05$ )، ولیکن در فولیکولهای با آنتروم گسترده افزایش مختصری مشاهده گردید که البته معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). مشخص شد که شروع بیان PCNA از اوایل رشد فولیکول Primary آغاز می شود. در گروه های مورد مطالعه سلول PCNA مثبت در فولیکولهای Primordial مشاهده نگردید.

**نتیجه نهایی:** بر طبق نتایج این مطالعه این فرضیه مطرح می شود که ممکن است افزایش ابتدایی در سلولهای گرانولوزا در فولیکولهای در حال رشد بواسطه سلولهای مجاور فولیکول و موجود در استرومای تخمدان صورت پذیرد. تغییرات هورمونی متعاقب کاهش هورمون های تیروئیدی ممکن است به شدت بر شاخص تکثیر سلولی اثر بگذارد و منجر به دژنراسیون سریعتر فولیکولها شود.

**کلید واژه ها:** استرئولوژی / تکثیر سلولی / فولیکولوزن / کم کاری تیروئید / موش

### مقدمه:

فولیکول ها، تخمک گذاری و آماده سازی لایه اندومتر رحمی برای لانه گزینی و حاملگی می شود (۱-۳). تخمدان، تکامل و آزادسازی اووسیت بالغ را تنظیم می کند و نیز هورمون هایی (مانند استروژن و پروژسترون) تولید می نماید که برای تکامل طی بلوغ و آماده سازی رحم برای آبستنی، لانه گزینی و مراحل اولیه حاملگی حیاتی هستند.

دستگاه تولید مثل زنان، تغییرات هورمونی لازم جهت بلوغ و عملکرد تناسلی بزرگسالان را تنظیم می کند. عملکرد تناسلی طبیعی در زنان، نیازمند تجمع پویای پیام های هورمونی هیپوتالاموسی، هیپوفیزی و تخمدانی است که منجر به چرخه های متناوب رشد و تکامل

\* کارشناسی ارشد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (moghadamDm1@mums.ac.ir)

\*\* استاد گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

\*\*\* استادیار گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

باورند که وجود هورمونهای تیروئیدی برای عملکرد صحیح دستگاه تناسلی امری ضروری است. بعلاوه عقیده براین است که احتمالاً تأثیر هورمونهای تیروئیدی بر هیپوفیز می تواند به تأثیرگذاری آن بر غدد اندوکرین انجامیده و به افزایش سطح هورمونهای جنسی منجر شود و چنانچه فعالیت تیروئید در ترشح هورمون با اختلال مواجه شود روند تکثیر و تمایز سلولهای جنسی و فعالیت غدد تناسلی می تواند با مشکل روبرو گردد (۲۱-۱۹). اکتای و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که PCNA یک مارکر حساس در مراحل اولیه رشد فولیکولار در تخمدان است و بیان آن و سنتز DNA تا حدودی با یکدیگر مطابقت دارد (۲۲).

تحقیقات انجام گرفته در این زمینه بسیار اندک بوده و بیشتر از جنبه مورفولوژیک به آن پرداخته شده است. به همین منظور در مطالعه حاضر با استفاده از تحلیل آماری دقیق، تغییرات ایندکس تکثیر سلولی ناشی از کاهش هورمونهای تیروئیدی به تفکیک انواع فولیکول در تخمدان رت بالغ و با روش استرئولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش کار:

این مطالعه یک پژوهش تجربی از نوع مداخله ای است که در آن به روش احتمالی و تصادفی ساده تعدادی رت ماده بالغ نژاد ویستار در سن ۲/۵ ماهگی و وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب گردیدند. حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، آب و غذای کافی و حرارت  $24 \pm 1$  درجه سانتیگراد مراقبت شدند. در نهایت از بین آنها تعداد ۱۰ سررت زنده که داروی پروپیل تیوراسیل (PTU) (خریداری شده از شرکت ایران هورمون) را بصورت محلول در آب آشامیدنی با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت سه هفته دریافت نموده و توسط تست رادیوایمونواسی (RIA) (Radioimmunoassay)، هیپوتیروئیدی در آنها مورد تأیید قرار گرفته بود بعنوان گروه تجربی قرار داده شدند. تعداد ۱۰ سررت زنده که آب آشامیدنی معمولی دریافت کردند بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. حجم نمونه در این مطالعه شامل تخمدانهای خارج شده از بدن ۲۰ سررت می باشد که بر اساس مطالعات تجربی انجام گرفته بدست آمده است (۲۳، ۲۴).

آزمون رادیوایمونواسی (RIA): برای حصول اطمینان از ایجاد

مراحل اولیه رشد فولیکول عمدتاً به وسیله فاکتورهای درون تخمدانی انجام می گیرد، در حالی که بلوغ فولیکول نیازمند تحریک ترکیبی FSH (هورمون محرک فولیکولی) و هورمون لوتئینیزان (LH) است. انتخاب فولیکول ثانویه از میان ذخیره فولیکول در حال استراحت نیازمند عملکرد مستقیم FSH است (۸-۴).

غده تیروئید، تولید کننده دوهورمون مرتبط با یکدیگر به نام های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) است. این هورمون ها اثرات خود را از طریق گیرنده های هسته ای اعمال می کنند و در خلال رشد، نقشی حیاتی در تمایز سلولی دارند و منجر به حفظ هوموستاز گرمایی و متابولیک در بالغین می شوند. اختلالات غده تیروئید اغلب در نتیجه فرآیند های خودایمنی ایجاد می شوند که موجب تحریک تولید بیش از حد هورمونهای تیروئیدی (تیروتوکسیکوز) یا تخریب غده و کاهش تولید هورمونهای تیروئیدی (هیپوتیروئیدی) می گردند. کمبود ید همچنان شایعترین علت هیپوتیروئیدی در تمام جهان محسوب می شود (۱۱-۹). بر اساس گزارش مرکز NP (Nurse Practitioner) در ایالات متحده آمریکا که یک سایت معتبر و پیشرفته در زمینه ثبت بیماریها (APRN) (Advanced Practice Registered Nurse) است، میزان شیوع هیپوتیروئیدیسم در مردان ۰/۲ درصد و در زنان ۲ درصد می باشد (۱۳، ۱۲).

در بعضی مطالعات مثل آنالیز فعالیت یک فاکتور رشد و ترکیبات ضد سرطان و داروها، ارزیابی سریع و دقیق سلولهای در حال تکثیر یک ابزار مهم می باشد. یک راه اندازه گیری سنتز DNA بعنوان یک نشانه از تکثیر سلولی است. در کنار این روشهای مستقیم، روشهای غیرمستقیمی نیز وجود دارد. در روشهای غیرمستقیم میزان فعالیت و تعداد مولکولهایی که سیکل سلولی را تنظیم می کنند، اندازه می گیرند (۱۴، ۱۵). از روشهای حساس برای تشخیص تکثیر سلولی تعیین مارکرهایی در فاز G1 چرخه سلولی از جمله Ki-67 و PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) می باشد. PCNA یک پروتئین هسته ای است که نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می کند. این پروتئین به همراه سیکلین D تکثیر سلولی در فاز S راکنترل می کند. این کمپلکس توسط فاکتورهای رشد گوناگون و دیگر محرکهای هورمونی ممکن است تغییر یابد (۱۸-۱۶).

بر اساس گزارشهای موجود بسیاری از محققین بر این

(DAB) انکوبه می شوند. نمونه ها با PBS و در مرحله بعد با آب مقطر شسته شده و سپس آب گیری با درجات صعودی الکل اتیلیک و شفاف سازی با زایلن انجام شده و نمونه ها با استفاده از چسب مخصوص مونته شده و آماده بررسی با میکروسکوپ نوری جهت بررسی سلولهای در حال تکثیر می گردند. سلولهای PCNA مثبت به رنگ قهوه ای نمایان خواهند شد (۲۵).

مرفولوژی فولیکولهای تخمدان: فولیکولهای تخمدان به انواع گوناگون تقسیم بندی شدند (۲۸-۲۶) و از بین آنها شش نوع فولیکول انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفت که شامل: ۱- فولیکول Primordial، هنگامی است که اووسیت توسط لایه ای از سلول های پهن فولیکولی در برگرفته می شود. ۲- فولیکول Primary، هنگامی است که اووسیت توسط سلول های مکعبی در برگرفته می شود. ۳- فولیکول Preantral، هنگامی است که فضاها بصورت پراکنده در بین سلول ها دیده شود. ۴- فولیکول Early antral، در مراحل ابتدایی تشکیل آنتروم. ۵- فولیکول Late antral، زمانی که آنتروم یک سوم حجم فولیکول را در برگیرد. ۶- فولیکول Tertiary (Graafin)، فولیکول انتخاب شده با فضائی بزرگتر از دوسوم حجم فولیکول می باشد.

تکنیک استرئولوژی (Stereology): از روش استرئولوژیک جهت شمارش هسته های قهوه ای رنگ استفاده گردید. در این روش از میان برشهای تهیه شده بطور تصادفی با فواصل برابر (سیستماتیک راندوم) چندین جفت برش انتخاب شد و فاصله برش اول و دوم در هر جفت برش انتخابی (عمق دایسکتور) طوری تعیین شد که از اندازه کوچکترین ذره مورد شمارش کمتر باشد. بر روی یک برش موازی (برش مرجع) بطور تصادفی تعدادی فریم (چهارچوب) نمونه برداری با مساحت معلوم قرارداد شد و بر روی برش دوم فریم های نمونه برداری دیگر طوری قرارداد شد که محل آن از نظر موقعیت مکانی دقیقاً با موقعیت فریمهای قرار گرفته بر روی برش اول یکسان باشد. حال تعداد مقاطع ذرات مارکدار که درون فریم های Unbiase برش اول دیده شدند ولی اثری از آنها در فریم های برش دوم نیست شمارش شدند. شمارش در برش دوم نیز انجام گرفت. مشابه این عمل بر روی برشهای موازی دیگر انجام شد. پس از آن با استفاده از فرمولهای ارائه شده در جدول ۱، تعداد هسته های مارکدار محاسبه شد (۲۹-۳۵).

هیپوتیروئیدی لازم است تا سطح هورمون های تیروئیدی در پلاسما خون رتها به روش رادیوایمونواسی اندازه گیری شود. به این منظور بعد از گذشت سه هفته از تجویز دارو با استفاده از لوله های شیشه ای موئینه استریل از ورید زاویه ای چشم حیوانات به میزان ۱ تا ۲ میلی لیتر خون گیری به عمل آمده و در لوله های هپارینیزه اپندرف به آزمایشگاه منتقل شد. پس از سانتریفوژ کردن، سرم خون جدا شده و با استفاده از کیت تجارتي IRMA (شرکت کاوشیار ایران، تهران) و به روش رادیوایمونواسی (RIA) سطح سرمی T3 و T4 هر یک از نمونه ها، در هر دو گروه تجربی و کنترل تعیین گردید. در پایان دوره، تخمدانهای نمونه های مربوط به همه گروهها پس از بیهوشی با اتر و پرفیوژن بطنی جدا گردید.

آماده سازی نمونه ها برای مطالعه هیستولوژیک: بعد از تشریح، چربیهای اضافی تخمدان ها با دقت جدا و سپس جهت حذف آب اضافی، بر روی کاغذ جاذب قرارداده شدند. در ادامه تخمدانها توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند. پس از تثبیت نمونه های بافتی در پارافرمالدئید ۴٪ حل شده در بافر فسفات (Phosphate Buffer Solution) PBS به مدت ۱۴ الی ۱۶ ساعت، توسط پروتکل آماده سازی بافتی آماده شدند. سپس برشهایی به قطر ۵ میکرومتر توسط میکروتوم تهیه و بر روی لامهای پلی الیزین قرار گرفتند. لام ها با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی PCNA رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

تکنیک تشخیصی PCNA: بخشی از برش های سریالی بدست آمده از هر نمونه با استفاده از متد ایمونوهیستوشیمی مبتنی بر به کارگیری آنتی بادی PCNA برای بررسی پدیده تکثیر سلولی در فولیکول های تخمدانی مورد ارزیابی قرار گرفتند. (کیت PCNA از شرکت Zymed خریداری شد). بعد از پارافین زدایی و آب دهی با درجات نزولی الکل اتیلیک نمونه ها سه بار با PBS شسته شده و سپس فعالیت پراکسیداز داخل بافت بوسیله آب اکسیژنه ۳ درصد در الکل متیلیک بلوکه می شود. سپس محلولهای بلوک کننده از روی مقاطع پاک شده و نمونه ها با آنتی بادی اولیه بیوتینه ضد PCNA به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه انکوبه می شوند. در مراحل بعدی مقاطع با استرپتاویدین پراکسیداز و دی آمینوبنزیدین

جدول ۱: فرمولها به ترتیب جهت محاسبه تعداد هسته های مارکدار در فولیکولهای تخمدان

| رابطه  | توضیحات  |
|--|--|
| $N_v = \frac{\sum q^-}{\sum F \cdot a(F) \cdot t}$                                     | $N_v$ تراکم عددی درواحد حجم ( $mm^{-3}$ )، $\sum q^-$ مجموع مقاطع هسته های مارکدارشمارش شده ، $\sum F$ مجموع فریم های مرتبط با ساختار مورد نظر، $a(F)$ مساحت واقعی هر فریم با توجه به بزرگنمایی ( $mm^2$ ) و $t$ عمق دایسکتور ( $mm$ ) (فاصله بین برش اول و دوم در هر جفت برش) |
| $V_R = t \cdot a(P) \cdot \sum_{i=1}^n P$  | $V_R$ حجم مرجع ( $mm^3$ )، $t$ فاصله دوبرش از یکدیگر (ضخامت مقطع) ( $mm$ )، $a(P)$ مساحت مرتبط با نقطه ( $mm^2$ )، $n$ تعداد مقطع و $\sum P$ مجموع نقاط برخورد کرده با ساختار مورد نظر   |
| $V_o = \frac{\sum P_i}{\sum P_R}$  | $V_o$ کسر حجمی باتراکم حجمی، $\sum P_i$ مجموع نقاط برخورد کرده با فولیکول و $\sum P_R$ مجموع نقاط در حجم مرجع  |
| $V_f = V_o \cdot V_R$  | $V_f$ حجم فولیکول ( $mm^3$ )، $V_o$ کسر حجمی و $V_R$ حجم مرجع ( $mm^3$ )   |
| $N = N_v \cdot V_f$  | $N$ تعداد کل هسته های مارکدار داخل فولیکول، $N_v$ تراکم عددی درواحد حجم $mm^{-3}$ و $V_f$ حجم فولیکول ( $mm^3$ )   |
| $PI = \frac{n_{follicle}^* \cdot n_{cell}^* \cdot 100}{n_{total_f} \cdot n_{total_c}}$ | $PI$ ایندکس تکثیر سلولی، $n_{follicle}^*$ تعداد فولیکولهای با سلولهای در حال تکثیر، $n_{cell}^*$ تعداد سلولهای در حال تکثیر در هر فولیکول، $n_{total_f}$ تعداد کل فولیکولها و $n_{total_c}$ تعداد کل سلولها در هر فولیکول  |

سرمی هورمون های T3 و T4 و تأیید هیپوتیروئیدی انجام گرفت. نتایج حاصل از آن در گروه های کنترل و هیپوتیروئید در جدول ۲ ارائه گردیده است. آنالیز آماری بر روی میانگین داده های حاصل از آزمون رادیوایمونواسی کاهش معنی داری ( $P < 0.001$ ) را در میزان هورمون های تیروئیدی در گروه هیپوتیروئید را نشان داد. وزن تخمدان ها: در یک بررسی ماکروسکوپی تخمدان های نمونه های کنترل و هیپوتیروئید توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند. نتایج حاصل از آن در جدول ۲ ارائه گردیده است. آنالیز آماری بر روی میانگین وزن تخمدان ها به شکل معنی داری ( $P < 0.001$ ) کاهش وزن را در گروه هیپوتیروئید نشان داد.

تجزیه و تحلیل آماری: نمونه های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ تحقیقاتی Olympus مدل BX51 و نرم افزارهای کامپیوتری Life science ، ImageJ ، ImageTools3 و Stereology Toolkit 1.4 مورد مطالعه قرار گرفتند. داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 16 مورد تحلیل آماری قرار گرفت. پس از کنترل نرمالیت به منظور وجود یا عدم اختلاف بین میانگین ها ، آزمون های آماری t-test و ANOVA انجام شد و نتایجی که دارای ارزش  $P < 0.05$  بود بعنوان نتایج معنی دار در نظر گرفته شد.

**نتایج:**

آزمون رادیوایمونواسی (RIA): این آزمون برای تعیین سطح

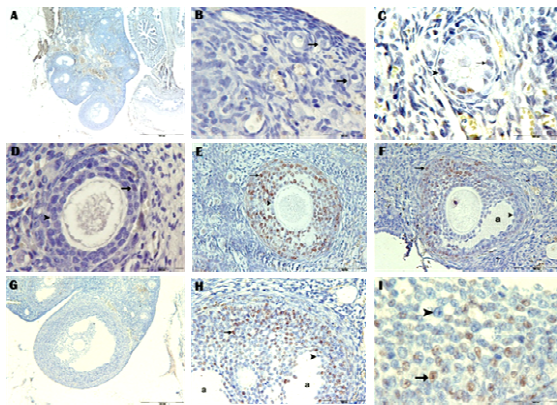
جدول ۲: مقایسه میانگین، انحراف معیار و خطای معیار میانگین سطح سرمی هورمون های T3 و T4 و وزن تخمدان ها در

| نمونه های کنترل و هیپوتیروئید |              |            |
|-------------------------------|--------------|------------|
| میانگین                       | انحراف معیار | خطای معیار |
| آزمون RIA (T3)                |              |            |
| ۸۵/۹۰                         | ۱۴/۴۷۹       | ۴/۵۷۹      |
| * ۵۴/۳۰                       | ۹/۷۹۹        | ۳/۰۹۹      |
| آزمون RIA (T4)                |              |            |
| ۴/۶۰۰                         | ۰/۴۵۲۲       | ۰/۱۴۳۰     |
| * ۳/۲۲۰                       | ۰/۶۸۴۴       | ۰/۲۱۶۴     |
| وزن تخمدان                    |              |            |
| ۰/۰۷۸۰                        | ۰/۰۰۷۸۹      | ۰/۰۰۲۴۹    |
| * ۰/۰۴۴۰                      | ۰/۰۱۰۷۵      | ۰/۰۰۳۴۰    |

\* مقادیر معنی دار در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۳: مقایسه میانگین، انحراف معیار و خطای معیار میانگین ایندکس تکثیر سلولی انواع فولیکولهای تخمدان در نمونه های کنترل و هیپوتیروئید

| نوع فولیکول  | میانگین  | انحراف معیار | خطای معیار |
|--------------|----------|--------------|------------|
| Primary      |          |              |            |
| کنترل        | ۴۲/۱۲۵۷  | ۱۵/۵۶۹۳۲     | ۶/۹۶۲۸۱    |
| هیپوتیروئید  | ۳۷/۷۶۵۶  | ۱۵/۳۳۰۲۳     | ۶/۱۸۵۵۸۹   |
| Preantral    |          |              |            |
| کنترل        | ۳۱/۲۷۸۸  | ۳/۴۱۸۱۳      | ۱/۵۲۸۶۴    |
| هیپوتیروئید  | *۱۶/۳۴۱۹ | ۱/۳۰۹۶۶      | ۰/۵۸۵۷۰    |
| Early antral |          |              |            |
| کنترل        | ۲۴/۳۲۱۷  | ۲/۱۴۹۱۷      | ۰/۹۶۱۱۴    |
| هیپوتیروئید  | *۱۳/۰۶۶۷ | ۳/۳۸۶۲۵      | ۱/۵۱۴۳۸    |
| Late antral  |          |              |            |
| کنترل        | ۲۳/۳۳۲۰  | ۸/۰۹۵۹۴      | ۳/۶۲۰۶۱    |
| هیپوتیروئید  | *۱۰/۲۸۲۳ | ۲/۵۶۲۵۰      | ۱/۱۴۵۹۹    |
| Graafian     |          |              |            |
| کنترل        | ۳۹/۶۵۲۵  | ۳/۱۸۹۲۶      | ۱/۴۲۶۲۸    |
| هیپوتیروئید  | *۱۵/۲۹۷۱ | ۱/۷۴۵۳۹      | ۰/۷۸۹۵۱    |



تصویر ۱: تکنیک ایمونوهیستوشیمی PCNA در فولیکولهای تخمدان، گروه کنترل. هسته های PCNA مثبت به رنگ قهوه ای نمایان شده اند. (A) تصویر کلی تخمدان با فولیکولهای آنترال وسیع، نقاطی که به رنگ قهوه ای نمایان شده اند نشان دهنده تظاهر سلولهای PCNA مثبت در تخمدان می باشد، بزرگنمایی  $\times 40$ . (B) فولیکول Primordial (پیکان ها)، عدم وجود سلول PCNA مثبت در سلولهای سنگفرشی در فولیکول، بزرگنمایی  $\times 100$ . (C) فولیکول Primary، سلولهای گرانولوزای مکعبی شکل بصورت واضح نمایان است، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 100$ . (D) فولیکول Preantral، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 100$ . (E) فولیکول Early antral با آنتروم کوچک، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، به تعداد فراوان سلولهای در حال تکثیر دقت نمایید، بزرگنمایی  $\times 40$ . (F) فولیکول Late antral با آنتروم حدود دوسوم حجم فولیکول (a)، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 40$ . (G) فولیکول Graafian با آنتروم بسیار گسترده بیشتر از دوسوم حجم فولیکول، بزرگنمایی  $\times 10$ . (H) فولیکول Graafian با آنتروم وسیع (a)، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، همان تصویر H از فولیکول Graafian، بزرگنمایی  $\times 40$ . (I) هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 100$ .

ایندکس تکثیر سلولی در فولیکولهای تخمدان: تکنیک ایمونوهیستوشیمی PCNA بر روی نمونه های هر دو گروه انجام گردید و سپس توسط روش استرئولوژیک جهت شمارش سلولها و محاسبه ایندکس تکثیر سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آن به تفکیک انواع فولیکولهای تخمدان به شرح زیر بدست آمد:

**فولیکول Primordial:** بررسی های انجام شده بر روی فولیکولهای پریموردیال در هر دو گروه کنترل و هیپوتیروئید ایندکس تکثیر سلولی برابر عدد صفر را نشان داد که بیانگر عدم بیان PCNA در این فولیکولها بود (تصاویر ۱ و ۲-B).

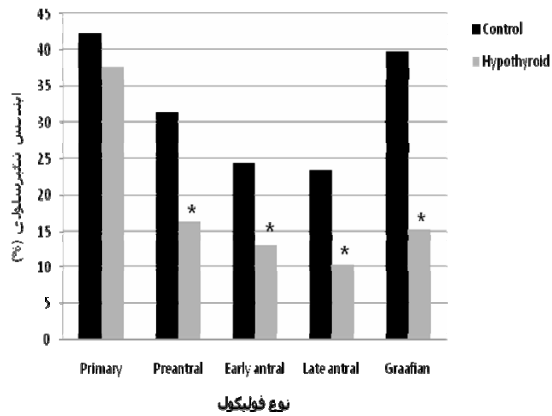
**فولیکول Primary:** فولیکولهای Primary در نمونه های هر دو گروه کنترل و هیپوتیروئید بصورت تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. در این فولیکولها سلولهای PCNA مثبت بطور پراکنده و اندک مشاهده گردید. در نمونه های مورد مشاهده ایندکس تکثیر سلولی محاسبه شد. آنالیز آماری بر روی داده ها اختلاف معنی داری بین گروه های مورد مطالعه نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۳، تصاویر ۱ و ۲-C).

**فولیکول Preantral:** نتایج حاصل از محاسبه ایندکس تکثیر سلولی کاهش معنی داری را بین گروه هیپوتیروئید نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P = 0.000$ ). سلول PCNA مثبت برای اولین بار در لایه تکا مشاهده گردید (جدول ۳، تصاویر ۱ و ۲-D).

**فولیکول Early antral:** میانگین ایندکس تکثیر سلولی در این فولیکولها کاهش معنی داری را بین گروه هیپوتیروئید نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ). سلولهای PCNA مثبت بطور پراکنده در بین سلولهای گرانولوزا مشاهده گردید (جدول ۳، تصاویر ۱ و ۲-E).

**فولیکول Late antral:** نتایج بدست آمده از محاسبه ایندکس تکثیر سلولی در این فولیکولها کاهش معنی داری در گروه هیپوتیروئید نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ). سلولهای PCNA مثبت هم در سلولهای گرانولوزا و هم در لایه تکا مشاهده گردید (جدول ۳، تصاویر ۱ و ۲-F).

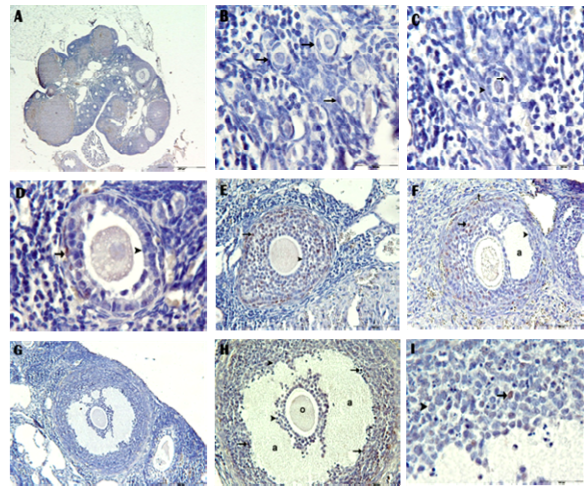
**فولیکول Graafian:** آنالیز آماری بر روی نتایج حاصل از محاسبه ایندکس تکثیر سلولی در این فولیکولها کاهش معنی داری را در گروه هیپوتیروئید نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P = 0.000$ ) (جدول ۳، تصاویر ۱ و ۲-G-I).



نمودار ۱: مقایسه میانگین ایندکس تکثیر سلولی در گروه های کنترل و هیپوتیروئید به تفکیک انواع فولیکولهای تخمدان \* موارد دارای اختلاف معنی دار  $P < 0.05$

PCNA برای اولین بار در فولیکولهای Primary مشاهده گردید. مشخص شد که PCNA در مراحل اولیه رشد فولیکول Primary به میزان اندک در سلولهای گرانولوزا بیان می شود. در کارپوس لوتئوم سلولهایی که PCNA در آنها ظاهر شده بود، بطور پراکنده وجود داشتند. در سلولهای لایه تکا اولین بار PCNA در فولیکولهای Preantral مشاهده شد. علی رغم مشاهده بیان PCNA در اووسیت در فولیکولهای در حال رشد، نمی توان بیان داشت که تقسیم سلولی در آنها در حال انجام است. زیرا می دانیم اووسیت ها در پستانداران در مرحله دیپلوتن چرخه سلولی متوقف هستند. در بررسی نتایج مشخص شد بیشترین سرعت تکثیر سلولی در فولیکولهای Preantral و Early antral صورت می گیرد.

آنالیز آماری بر روی میانگین ایندکس تکثیر سلولی در گروه کنترل نشان داد که فولیکول Primary با فولیکولهای Preantral و Graafian اختلاف معنی داری ندارد، ولیکن با فولیکولهای Early antral و Late antral تفاوت معنی داری را نشان داد. این شاخص در فولیکول Preantral با هیچ یک از فولیکولها اختلاف معنی داری را نشان نداد. ایندکس تکثیر سلولی در فولیکول Late antral با فولیکولهای Primary و Graafian تفاوت معنی داری داشت. شاخص تکثیر سلولی در فولیکول Graafian تنها با فولیکول Late antral اختلاف معنی داری را نشان داد. در گروه هیپوتیروئید شاخص تکثیر سلولی در فولیکول Primary اختلاف معنی داری را با دیگر فولیکولهای تخمدان نشان داد. ایندکس تکثیر سلولی در فولیکولهای



تصویر ۲: تکنیک ایمنونوهیستوشیمی PCNA در فولیکولهای تخمدان، گروه هیپوتیروئید. هسته های PCNA مثبت به رنگ قهوه ای نمایان شده اند (A). تصویر کلی تخمدان با فولیکولهای آنترال کم و تعداد زیاد کارپوس لوتئوم، نقاطی که به رنگ قهوه ای نمایان شده اند نشان دهنده تظاهر سلولهای PCNA مثبت در تخمدان می باشد، بزرگنمایی  $\times 4$ . فولیکول Primordial (پیکان)، عدم وجود سلول PCNA مثبت در سلولهای سنغرفشی در فولیکول، بزرگنمایی  $\times 100$  (C). فولیکول Primary، سلولهای گرانولوزای مکعبی شکل بصورت واضح نمایان است، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 100$  (D). فولیکول Preantral، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 100$  (E). فولیکول Early antral با آنتروم پراکنده در بین سلولهای گرانولوزا، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، بزرگنمایی  $\times 40$  (F). فولیکول Late antral با آنتروم حدود دوسوم حجم فولیکول (a)، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، به سلولهای حاوی PCNA در لایه تکا (t) دقت نمائید، بزرگنمایی  $\times 40$  (G). فولیکول Graafian با آنتروم بسیار گسترده بیشتر از دوسوم حجم فولیکول، بزرگنمایی  $\times 20$  (H). فولیکول Graafian با آنتروم وسیع (a)، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان)، اووسیت (o)، بزرگنمایی  $\times 40$  (I). همان تصویر از فولیکول Graafian، هسته سلول گرانولوزا PCNA مثبت (پیکان)، هسته سلول گرانولوزا PCNA منفی (سرپیکان) بزرگنمایی  $\times 100$ .

بررسی نتایج حاصل از محاسبه ایندکس تکثیر سلولی در گروه های مورد مطالعه به تفکیک نوع فولیکول: مطالعه ایندکس تکثیر سلولی در انواع فولیکولهای تخمدان در گروه های کنترل و هیپوتیروئید نشان داد که بیشترین مقدار آن در فولیکول Primary و کمترین میزان آن در فولیکول Late antral موجود می باشد (نمودار ۱).

و به تبع آن کاهش هورمون های تیروئیدی می تواند در رابطه باموضوع حاملگی بصورت کاهش باروری، سقط جنین و بروز نقایص جنینی از جمله نقص در تکامل و عملکرد این سیستم بروز نماید (۳۹،۴۰). در مطالعه ای که توسط زرتاشیا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت، اثر هیپوتیروئیدسم القاء شده توسط PTU و TU بر روی تکامل سیستم تناسلی نر و ماده در نوزادان موش و تغییرات بافت شناسی آن مورد بررسی قرار گرفت. شواهد در این مطالعه کاهش معنی داری را در فولیکولهای تخمدانی نشان داد ولی اثرات تأخیری بر تکامل تخمدان در موش ها در طول دوران نوزادی آنقدر جدی نبود تا تأثیر مخربی را بردستگاه تناسلی در رتهای هیپوتیروئید بگذارد. اعمال PTU بعد از تولد باعث کاهش نسبی وزن بدن و گنادها می شود. این بخوبی نمایان می کند که هورمون تیروئیدی در طول آغاز دوران زندگی بعد از تولد در خصوص رشد و تکامل فیزیکی و وزن تخمدان ها تأثیر بسیار زیادی دارند (۴۱). با بررسی مطالعات پیشین روشن شده است که برخی فاکتورهای رشد و هورمونهای اندوکرین بر فرآیند تکثیر سلولی در سلولهای فولیکولار تخمدان نقش اساسی ایفا می کنند. براین اساس کاهش هورمون های تیروئیدی بطور مشخص چه تأثیری بر ایندکس تکثیر سلولی در فولیکولهای تخمدان خواهد گذاشت؟

اندازه گیری سنتر DNA بعنوان یک نشانه از تکثیر سلولی است. در اکثر موارد عبور سلول از فاز G1 به فاز S مرحله اساسی برای ورود سلول به تقسیم است و در همین مرحله است که تقسیم سلولی تنظیم می گردد. عبور از مراحل مختلف سیکل سلولی بوسیله یک گروه از کینازها به نام کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) کنترل می گردد (۲۲). آنتی ژن هسته ای تکثیر سلولی (PCNA) که قبلاً بعنوان سیکلین نیز شناخته می شده است، یک پروتئین غیرهستونی ۳۶ کیلو دالتونی است که برای DNA پلیمراز - دلتا نقش کمکی دارد. این آنزیم پلیمراز در طول نسخه برداری و ترمیم DNA لازم است. همچنین PCNA با کینازهای وابسته به سیکلین که در کنترل سیکل سلولی نقش دارند، فعل و انفعال نشان می دهد. در طول فاز آخر G1 مقدار آن در سلول افزایش یافته در فاز S به حداکثر میزان خود رسیده و بعد از فاز G2 از میزان آن کاسته می شود (هرچند بعضی مطالعات نشان می دهد که مقدار آن در فاز G2 و M به حداکثر میزان خود می رسد). بیان

Graafian و Late antral، Early antral، Preantral تفاوت معنی داری را نشان ندادند (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج آزمون آنوا و توکی بر روی میانگین ایندکس تکثیر سلولی در گروه های کنترل و هیپوتیروئید به تفکیک انواع فولیکولهای تخمدان

| Graafian | Late antral | Early antral | Preantral | Primary |
|----------|-------------|--------------|-----------|---------|
| ۳۰       | ۳۰          | ۳۰           | ۳۰        | ۳۰      |
| +        | -           | +            | +         | +       |
| -        | -           | -            | -         | +       |
| -        | -           | -            | -         | +       |
| -        | +           | -            | -         | +       |
| -        | -           | +            | -         | -       |

+ (تفاوت معنی دار)، - (عدم وجود تفاوت معنی دار)

### بحث:

هیپوتیروئیدی اولیه که در آن تولید و ترشح هورمونهای تیروئیدی (T3, T4) کاهش می یابد یکی از انواع کم کاری تیروئید است. هردوی این هورمون ها بصورت متصل به پروتئین های پلاسما در گردش خون انتقال پیدا می کنند (۱-۳).

مطابق با یک فرضیه تأثیر هورمون های تیروئیدی بر هیپوفیز، ترشح ملاتونین در غده پینه آل را متوقف می سازد و به جای آن، تولید کاتکولامین ها افزایش می یابد. کاهش سطح ملاتونین به سهم خود می تواند سطح استروژن را در گردش خون افزایش داده و به برهم خوردن محیط اندوکرین منجر شود، تا آنجا که بازدارندگی فعالیت محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی را در ارتباط با ترشح آندروژن ها و فعالیت های تولید مثل به دنبال داشته باشد (۳۶). براساس مطالعات انجام گرفته، محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی در انسان از حدود هفته چهارم و پنجم جنینی شروع به شکل گیری نموده و تا هفته های سی ام تا سی و پنجم بارداری کامل می شود در حالی که این وقایع در رت، از زمان تولد آغاز و به فاصله تقریبی چهار هفته پس از آن به انجام می رسد (۳۷). نحوه عملکرد محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی به گونه ای است که به برقراری ارتباط با گنادها انجامیده و به کنترل فیدبکی مربوط به ترشح هورمون ها و متعادل نگه داشتن سطح آنها کمک می نماید (۳۸).

شواهد موجود براین موضوع دلالت دارد که کمبود یید

با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد. مطابق نتایج پژوهش قبل این گروه، ایندکس آپوتوتیک در فولیکول Graafian منتخب با توجه به وجود آنتروم وسیع و حاوی مایع فولیکولار جهت حفظ و پایداری فولیکول به ویژه در گروه هیپوتیروئید کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. ایندکس تکثیر سلولی اگرچه در گروه هیپوتیروئید نسبت به فولیکول Late antral افزایش را نشان داد ولیکن در مقام مقایسه با فولیکول Graafian در گروه کنترل کاهش معنی داری داشت.

با توجه به مطالب بیان شده حدس زده می شود که ممکن است کاهش هورمون های تیروئیدی منجر به کاهش معنی دار ایندکس تکثیر سلولی در فولیکولهای تخمدان شود که این کاهش در فولیکول های با آنتروم وسیع (فولیکول Graafian) بصورت معنی داری باشد. بنابراین با توجه به این فرضیه در فولیکولهای با آنتروم گسترده چنانچه فولیکول وارد مرحله تخمک گذاری نشود به دلیل کاهش شاخص تکثیر سلولی در آن به سرعت دژنراسیون در آن اتفاق می افتد. مشخص شد که بیشترین ایندکس تکثیر سلولی در فولیکول Primary و بعد از آن در فولیکول Preantral اتفاق می افتد، بنابراین ممکن است بیشترین سرعت تکثیر سلولی و رشد فولیکول حاصل فعالیت فاکتورهای تکثیر سلولی در این دو فولیکول باشد. اگرچه هیپوتیروئیدی باعث اختلال در روند تولید مثلی می شود ولیکن به دلیل مکانیزم بیان شده این تنظیمات طوری صورت خواهد گرفت که فولیکول منتخب بتواند وارد مرحله تخمک گذاری گردد.

طبق مطالعات گذشته و نیز پژوهش حاضر مشخص شد که بیان PCNA بعد از شروع رشد فولیکول از آغاز می گردد. عدم حضور PCNA در برخی از سلولهای گرانولوزای توسعه یافته نشان می دهد که ممکن است سلول در فاز M از چرخه سلولی باشد. این نتایج نشان می دهد که میان بیان PCNA و آغاز تکثیر سلولی همگامی و مطابقت وجود ندارد (۲۲). با توجه به مطالعه پیشین همین گروه بر روی شاخص آپوتوز و نتایج این تحقیق که کاهش معنی دار ایندکس تکثیر سلولی در فولیکولهای گروه هیپوتیروئید را نشان داد، این مطالب به وضوح دلیل کاهش معنی دار وزن تخمدانها در گروه هیپوتیروئید را اثبات می کند (۴۶).

بعد از تشکیل فولیکول Preantral و تا مرحله تشکیل فولیکول Graafian، ایندکس تکثیر سلولی در گروه

PCNA یک ارتباط مستقیم با فعالیت میتوزی دارد. بنابراین می توان از آن بعنوان یک نشانه تکثیر سلولی استفاده کرد (۴۵-۴۲).

در مطالعه حاضر مشخص گردید که شاخص تکثیر سلولی در فولیکولهای Primordial در هر دو گروه برابر صفر بود که این مطلب مشخص کننده این موضوع است که بیان PCNA در سلولهای فولیکولار تخمدان از مرحله آغاز تشکیل فولیکولهای Primary آغاز می گردد. بر طبق نتایج مطالعه ای که همین گروه بر روی تأثیر کاهش هورمونهای تیروئیدی بر شاخص آپوتوتیک در فولیکولهای تخمدان انجام داد، مشخص شد که سلولهای آپوتوتیک در فولیکولهای Primordial وجود ندارند. بنابراین این فرضیه که حدود ۹۹٪ از ذخیره فولیکولها در مراحل ابتدایی شروع تشکیل فولیکولهای Primary دچار دژنراسیون می گردند اثبات می شود (۸).

در فولیکولهای Primordial، ایندکس تکثیر سلولی در هر دو گروه مورد مطالعه عدد صفر را نشان داد. این نتایج بیان می کند که PCNA در سلولهای فولیکولاری بیان نشده است. بر طبق مطالعات انجام گرفته و نتایج حاصل از این تحقیق و با توجه به عدم بیان PCNA در این فولیکولها، این احتمال وجود دارد که تجمع و افزایش ابتدایی سلولهای گرانولوزا در مراحل ابتدایی رشد فولیکولار نتیجه همگرایی سلولهای مجاور در استرومای تخمدان باشد. ایندکس تکثیر سلولی در گروه کنترل از فولیکولهای Primary تا فولیکول Late antral روند کاهشی داشته، ولیکن در فولیکول Graafian بطور معنی دار افزایش را نشان می دهد. در گروه هیپوتیروئید نیز ایندکس تکثیر سلولی از فولیکول Primary تا فولیکول Preantral کاهش معنی دار را نشان داد، سپس تا مرحله فولیکول Late antral روند کاهشی داشت و سرانجام در فولیکول Graafian یک افزایش در ایندکس تکثیر سلولی در گروه هیپوتیروئید مشاهده گردید.

در مطالعه ای بیان گردیده که برداشت ید در مایع فولیکولار تخمدان بعد از غده تیروئید از همه اعضاء بدن بیشتر می باشد و توسط استروژن و یک حالت هیپوتیروئید افزوده خواهد شد (۴۶). بر اساس مطالعات انجام شده ثابت گردیده است که فاکتورهای رشد و محرکهای هورمونی ممکن است بیان PCNA را تغییر دهند (۴۵، ۴۳). از طرفی ایندکس تکثیر سلولی نیز در فولیکول Graafian گروه کنترل افزایش معنی داری دارد و در گروه هیپوتیروئید در مقایسه



- phogenetic protein signalling pathway. *J Reprod* 2009; 138(4): 689 - 96.
- Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* 1998; 3(3): 183-95.
  - Codon SM, Estecondo SG, Galindez EJ, Casanave E B. Ultrastructure and morphometry of ovarian follicles in armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). *Braz J Biol* 2001; 61(3): 485-96.
  - Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B* 1963; 158: 417-33.
  - Baker TG. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. *J Anat* 1966; 100: 761-76.
  - Hirshfield AN. Development of the follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
  - Marion GB, Gier HT. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the nonpregnant female mammal. *J Anim Sci* 1971; 32(Suppl 1): 24-47.
  - Nelson JF, Gosden RG, Felicio LS. Effect of dietary restriction on estrus cyclicity and follicular reserve in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1985; 32: 515-22.
  - Bharaktya S, Griffing GT. Hypothyroidism. 2010 Mar 31; [cited 2011 May 12]: [about 16 p.]. Available from: <http://www.emedicine.medcape.com/article/122393>.
  - Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL. [Harrison's principles of internal medicine]. Translated by M. Ebrahimpoor. 17th ed. Tehran: Nore danesh, 2008: 101-137. (Persian)
  - Guyton AC, Hall JE. [Textbook of medical physiology]. Translated by H. Sepehri. 12th ed. Tehran: Andishe rafi, 2011: 1158-1171. (Persian)
  - Hapon M B, Gamarra- Luques C, Jahn G A. Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 1.
  - Elliott B. Diagnosing and treating hypothyroidism. *Nurse Pract* 2000; 25(3): 92-4, 99-105.
  - Hirshfield AN. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 1989; 41: 309-316.
  - Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-192.
  - Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991; 65: 691-99.
  - Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71: 505-514.
  - Liu Y, Marraccino RL, Keng PC. Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 1989; 28: 2967-2974.
  - De Moraes GV, Vera Avila HR, Lewis AW,

هیپوتیروئید کاهش معنی داری را نشان داد. این نتایج به همراه تجربیات قبل بیان می دارد که ممکن است تأثیر کاهش هورمون های تیروئیدی بر ایندکس تکثیر سلولی از زمان تشکیل آنتروم در فولیکولها آغاز گردد. این مطالب بیان می کند که فاکتورهای موجود در مایع فولیکولار تأثیر بسیار مهم بر ایندکس تکثیر سلولی دارند. در تحقیقات انجام شده حضور هورمون های تیروئیدی بویژه هورمون T3 در مایع فولیکولارونیز وجود رسپتورهای آنها در سلولهای گرانولوزا به اثبات رسیده است (۴۷).

پیشنهاد می گردد در مطالعه ای تجربی عوامل مؤثر بر کاهش شاخص تکثیر سلولی در فولیکول Grrafian به ویژه فاکتورهای موجود در مایع فولیکولار و نیز گیرنده های سلولی هورمون های تیروئیدی در سلولهای گرانولوزا مورد ارزیابی قرار گیرد تا بطور دقیق مشخص گردد چه عواملی این اثرات را فراهم می کنند.

### نتیجه نهایی:

طبق نتایج این مطالعه این فرضیه مطرح می شود که با توجه به اینکه در مراحل رشد اولیه فولیکولار در هیچ سلول گرانولوزا PCNA بیان نشد بنابراین ممکن است افزایش ابتدایی در سلولهای گرانولوزا در فولیکولهای در حال رشد بواسطه سلولهای مجاور فولیکول و موجود در استرومای تخمدان صورت پذیرد. کاهش هورمون های تیروئیدی، ممکن است تغییرات وسیع هورمونی را سبب گردد که موجب می شود فاکتورهای موجود در مایع فولیکولار به ویژه در فولیکولهای آنترال با آنتروم گسترده دچار تغییر شده و فرآیند تکثیر سلولی به شدت کاهش یابد و چنانچه فولیکول وارد مرحله تخمک گذاری نگردد با سرعت بیشتری نسبت به فولیکولها در گروه کنترل دژنره شده و تبدیل به جسم زرد گردد.

### سپاسگزار:

این مقاله منتج از پژوهشی است که با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه هیستوشیمی گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی اجرا گردیده است. بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از تمامی همکاران و کسانی که در این امر ما ریااری نموده اند اعلام می داریم.

### منابع:

- Ruoss C, Tadros A, O'Shea T, McFarlane J, Almahbobi G. Ovarian follicle development in Booroola sheep exhibiting impaired bone mor-

- Koch JW , Neuendorff DA , Hallford DM, et al. Influence of hypo – or hyperthyroidism on ovarian function in brahman cows. *J Anim Sci* 1998; 76(3): 871-9 .
20. Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* 2009 ; 81(1): 16 - 25.
  21. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996 ; 1(3) : 162-172 .
  22. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the Rat. *Biol Reprod* 1995; 53: 295-301.
  23. Behnam-Rassouli M, Herbert LC, Howard V, Phavoah PO, Stanisstreet M. Effect of propyl thiouracil treatment during prenatal and early postnatal development on the neocortex of rat pups. *Neuroendocrinology* 1991; 53(4): 321-7.
  24. Gottesfeld Z, Butler IJ, Findly WE. Prenatal and postnatal hypothyroidism abolishes lesion-induced noradrenergic sprouting in the adult rat. *J Neurosci Res* 1984; 14: 61-69.
  25. Picut CA, Swanson CL, Scully KL, Roseman VC, Parker RF, Remick AK. Ovarian follicle counts using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and semi-automated image analysis in Rats. *Toxicol Pathol* 2008;5:674-79.
  26. Peters H, Byskov AG, Grinstead J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clin Endocrinol Metab* 1978; 7:469-83.
  27. Hirshfield AN, Midgley AR. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 1978; 19:597-605.
  28. Pedersen T. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol* 1970;64:304-23.
  29. Behnam-Rassouli M, Nikravesh MR, Mahdavi SN, Tehranipour M. [Post operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a stereological counting method (Dissector)]. *Iranian Biomed* 2000;4:41-9. (Persian)
  30. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379–94.
  31. Gundersen HJ, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc* 1999;193: 199-211.
  32. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:857–81.
  33. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231: 482-97.
  34. Melo SR, Souza RR and Mandarim-de-Lacerda CA . Stereologic study of the sinoatrial node of rats-age related changes. *Biogerontology* 2002;3: 383-90.
  35. Charleston LB, Thyer AC, Klein NA, Soules MR, Charleston JS. An improved method for the production of slides from oversized samples of glycol methacrylate-embedded tissues: Application for optical disector based stereology. *J Histotechnol* 2003;26: 49-52.
  36. Sinha Hikim AP , Rajavashisth TB , Sinha Hikim I , Lue Y , Bonavera JJ , Leung A. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 1997; 57: 1193-201.
  37. Jannini EA , Ulisse S , D Armiento M . Thyroid hormone and male gonadal function . *Endocr Rev* 1995;16: 443-59 .
  38. Krassas GE , Perros P .Thyroid disease and male reproductive function. *J Endocrinol Invest* 2003;26(4):372-80.
  39. Calikoglu AS , Gutierrez OG , Ercole J . Congenital hypothyroidism delays the formation and retard the growth of the mouse primary somatic sensory cortex. *Neurosci Lett* 1996; 213: 132-6.
  40. Porterfield SP, Henderson CE .The role of thyroid hormone in prenatal and neonatal neurological development current perspectives . *Endocr Rev* 1993;14:94-106.
  41. Zertashia A, Jalali S, Ahmad L, Mirza A. Effect of hypothyroidism induced by propylthiouracil on ovarian function and structure in offspring from treated mother(Rats). *J Exp Zool* 2002 ; 293(4) : 407- 13 .
  42. Hirshfield AN. Patterns of [3H]thymidine incorporation differ in immature rats and mature, cycling rats. *Biol Reprod* 1986; 34:229-35.
  43. Chang CD, Ottavio L, Travalli S, Lipson KE, Baserga R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen. *Mol Cell Biol* 1990; 10:3289-86.
  44. Hall PA, Levison DA, Woods AL. PCNA immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162:285-94.
  45. Jaskulski D, Gatti C, Travali S, Calabretta B, Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988; 263:10175-79.
  46. Dijkstra G , de Rooij DG , de Jong FH , Van der

Hurk R . Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development , granulose cell proliferation and peripheral hormone levels in the pre-pubertal rat. *Eur J Endocrinol* 1996 ; 134(5): 649-54 .

47. Slebodzinski AB. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid the enigma of the thyroid ovary interaction . *Domest Anim Endocrinol* 2005 ; 29(1):97-103 .