بررسی اثر اسید پکتیک بر مورفولوژی، بقا و عملکرد دودمان سلولی GH_3/B_6

دلارام اسلیمی اصفهانی[۱]، حوری سپهری[۱*]، بهرام گلیایی[۲]، یا سمن رسولی[۱]
[۱] گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[*] مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: hsepehri@khayam.ut.ac.ir
(دریافت: ۸۴/۹/۲۸ ؛ پذیرش:۸۵/۴/۴)

چکیده

دودمان سلولی هیپوفیز موش صحرایی تحت عنوان GH3و زیر کلون آن GH3/B6 ویژه ترشح هورمون پرولاکتین و هورمون رشد می‌باشند. این سلولها بطور گسترده برای بررسی اثر مواد مختلف روی ترشح پرولاکتین به صورت"in vitro" بکار می‌روند. محیط کشت مورد استفاده برای این سلولها، Ham's F12 حاوی ۲/۵ ٪ سرم جنین گاو و ۱۵ ٪ سرم اسب می‌باشد. زمان دو برابر شدن سلولها۳۰ تا ۵۲ ساعت است که به کیفیت سرم مورد استفاده بستگی دارد مطالعات نشان داده‌اند که اسید پکتیک یکی از عوامل افزایش دهنده مقدار ترشح پرولاکتین در این سلول‌ها در انکوباسیون‌های کوتاه مدت می‌باشد. انکوبه کردن سلولها با اسید پکتیک به مدت ۳۰ دقیقه شکل سلولها را تغییر داده، سلول‌ها شروع به گرد و برجسته شدن کرده و حالت ترشحی به خود گرفتند. اسید پکتیک تاثیری در تعداد سلول‌ها نسبت به نمونه شاهد نداشت. محلول اسید پکتیک، محیط کشت را اسیدی می‌کند و باعث ایجاد شرایط نامطلوب برای سلول‌ها می‌شود. برای رفع این مشکل از محیط کشت حاوی Hepes به عنوان بافر برای ثبات pH استفاده شد ولی به مرور زمان شکل ظاهری سلول‌ها تغییر کرد و رشد آنها کاهش یافت. سلول‌ها گرد شدند، غشاء آنها گرانوله شد و درصد سلول‌های زنده کاهش پیدا کرد. این تغییر وضعیت سلول‌ها به دلیل تشکیل هیدروژن پر اکسید توسط Hepes می‌باشد. برای طبیعی ماندن مقدار pH محیط کشت و خنثی نمودن اسیدیته اسید پکتیک از محلول NaOH استفاده گردید که تاثیری بر سلول‌ها نداشت و بدینوسیله pH در حد ۷/۲ ثابت شد.

واژه‌های کلیدی: GH_3/B_6 cells دودمان سلولی، پرولاکتین , اسید پکتیک.

مقدمه:

دودمان سلولی کلون شده GH3/B6 که از سلولهای توموری هیپوفیز موش صحرایی بدست آمده است، هورمون پرولاکتین را سنتز و ترشح می‌کند (Tashjian *et al.* 1968, Tashjian *et al.* 1970). این سلولها، مقدار زیادی از خصوصیات سلولهای نرمال هیپوفیز را حفظ کرده و برای مطالعه فاکتورهای تنظیم کننده که بر عمل سلولهای نرمال هیپوفیز مؤثرهستند، مدل مناسبی به وجود آورده‌اند. بیشتر این فاکتورها از هیپوتالاموس آزاد می‌شوند. تعدادی از این فاکتورهای تنظیم کننده دارای نقش تحریکی بر ترشح پرولاکتین وتعدادی دارای نقش مهاری‌اند. از فاکتورهای تحریکی می‌توان به هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH)، پپتید روده‌ای فعال کننده رگها (VIP)، فاکتور محرک رشد اپیدرمی(EGF) و استروژن اشاره کرد. (Heany *et al.* 2004, Heany *et al.* 2002, de Carvalho *et al.* 2002, Mallo *et al.* 1995, Avery *et al.* 1992, Ishihara *et al.* 1991). و از فاکتورهای مهاری می‌توان به دوپامین (DA) وعوامل آگونیست آن، سوماتوستاتین(SS) و هیستیدیل-پرولین-دی کتو پیپرازین (HPDP) اشاره کرد (Ben-Jonathan *et al.* 2001 Meucci *et al.* 1992, Martinez & weiner 1992).

سلولهای GH_3/B_6 نسبت به تغییر شرایط کشت بسیار حساس می‌باشند. به وجود آمدن شرایط نامطلوب برای رشد این سلولها باعث تغییر در زمان دو برابر شدن وتاثیر بر ترشح هورمون توسط آنها می-گردد.

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که عصاره حل‌شده گیاهان شیرزا، ترشح پرولاکتین را از هیپوفیز قدامی تحریک می‌کند (Sawadogo *et al.* 1988). بررسی‌ها نشان داده که این مواد توسط آنزیم‌های پرتئولیتیک تجزیه نشده، در اتانول حل نمی‌شوند و از جنس پلی ساکارید می‌باشند. با استفاده از روشهای مختلف کروماتوگرافی و تکنیکهای پیشرفته جداسازی نشان داده شده است که بخش موثر این ترکیبات در اغلب موارد از مشتقات پکتین‌ها می‌باشند. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تزریق داخل وریدی اسید پکتیک به حیوانات آزمایشگاهی ترشح پرولاکتین و هورمون رشد را تحریک می‌کند. این مواد تحت شرایط"in vitro" باعث افزایش ترشح PRL از بافت هیپوفیز موش می‌شوند (Sawadogo *et al.* 1988, Sepehri *et al.* 1989)

(Sepehri *et al.* 1990, Sepehri *et al.* 1992).

در این تحقیق به بررسی اثرتغییر کیفیت سرم ،استفاده از محیط کشت حاوی Hepes به عنوان بافر برای تنظیم pH محیط (Bowman *et al.* 1985) همراه با اسید پکتیک و تاثیر اسید پکتیک بر مورفولوژی، تعداد سلول و مقدار کل پروتئین در سلولهای GH3/B6 به صورت "in vitro" پرداخته شده است.

مواد و روش کار

کشت سلول‌های GH_3/B_6 با سرم های مختلف:

سلول‌های GH_3/B_6 درمحیط کشت Ham's F12 حاوی سرم جنین گاو ۲/۵٪ و سرم اسب ۱۵٪ کشت داده شدند. سرم اسب مورد استفاده برای سلولها از شرکتهای Gibco ، HIMEDIA و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید و اثرات آنها به روی رشد، تکثیر و شکل ظاهری سلولها بررسی شد.

کشت سلول‌های GH_3/B_6 با محیط کشت حاوی Hepes:

برای اثر دادن اسید پکتیک بر روی سلولها باید اسید پکتیک در محیط کشت حل شود. پس از حل شدن، اسیدپکتیک باعث کاهش pH محیط می‌گردد. pH اندازه‌گیری شده، در حدود ۳ می‌باشد که کاملاً برای سلولها نامناسب است. در ضمن در این pH، اسید پکتیک به خوبی در محیط کشت حل نمی‌گردد. در ابتدا برای حل این مشکل از محیط کشت حاوی Hepes استفاده گردید. Hepes به عنوان بافر پس از حل شدن اسید پکتیک باعث حفظ pH محیط در حدود ۷/۲ شد. برای بررسی اثر Hepes ، محیط Ham's F12 حاوی Hepes از شرکت HIMEDIA تهیه گردید و سلولها در این محیط کشت داده شدند. اثر Hepes روی شکل ظاهری سلولها بررسی شد و سپس برای مطالعه اثر آن بر درصد سلولهای زنده، محیط کشت سلولها جمع آوری شد. سپس سلول‌ها با PBS استریل شستشو داده شدند. پس از آن با تریپسین ۰/۲۵٪ و EDTA ۰/۰۳٪ درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از جدا شدن سلولها، هم حجم تریپسین EDTA، به آنها محیط کشت توام با سرم اضافه شد و سپس سانتریفوژ شدند. سلولها به نسبت یک به نه با رنگ تریپان بلو که در سلولهای مرده نفوذ می‌کند مخلوط شده و بعد از دو الی سه دقیقه شمارش انجام شده و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید.

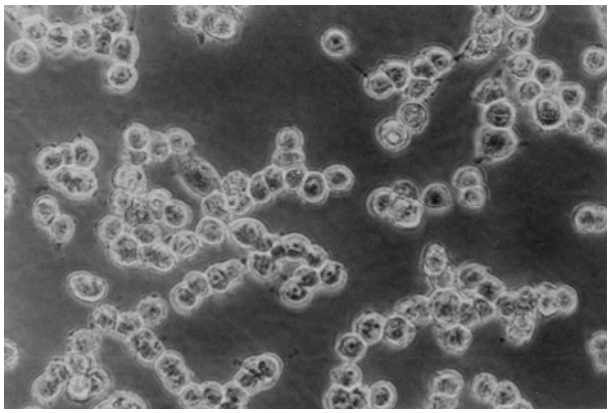
کشت سلول‌های GH_3/B_6 با محیط کشت حاوی اسیدپکتیک و TRH:

برای مشاهده اثر اسید پکتیک بر سلولها، 5×10^4 سلول در پلیتهای ۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت ریخته شد و به مدت ۶ روز در انکوباتور C ۳۷° قرار گرفت. در روز سوم محیط کشت سلولها تعویض گردید. در روز ششم محیط رویی سلولها برداشته و به سلولها، محیط کشت حاوی اسیدپکتیک و TRH اضافه شد. یک خانه به عنوان شاهد آزمایش، یک خانه برای TRH با غلظت 50nM و دوخانه برای اسیدپکتیک با غلظتهای ۲/۵ μg/ml و ۱۰۰ μg/ml در نظر گرفته شد (Sepehri *et al.* 2000). پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه، سلولها توسط میکروسکوپ Invert بررسی شده و از آنها عکس گرفته شد. سپس سلول‌ها شمارش شده و مقدار پروتئین آن‌ها توسط روش Lowry اندازه‌گیری گردید.

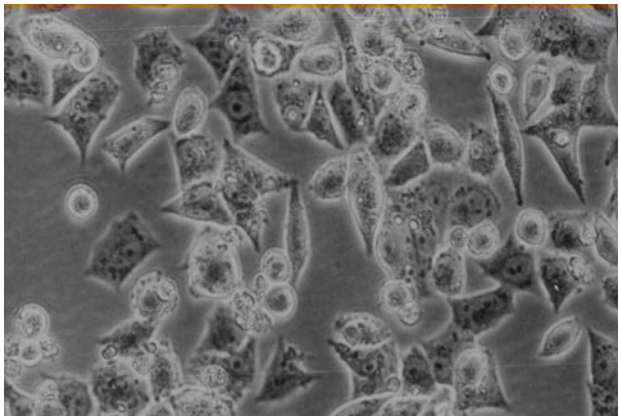
نتایج

اثر سرم‌های مختلف بر رشد سلول‌های GH_3/B_6:

سلول‌های تغذیه شده با سرم شرکت Gibco از نظر ظاهری کاملاً دارای وضعیت مساعد بودند. در شکل ۱ وضعیت سلولها پس از زمان کوتاهی که از کشت آنها گذشته است، نشان داده شده است. شکل ۲ سلولها را پس از اینکه کاملاً به سطح فلاسک چسبیده و در حال تکثیر وتقسیم هستند نشان می‌دهد، سلولها کشیده و گسترده‌اند.

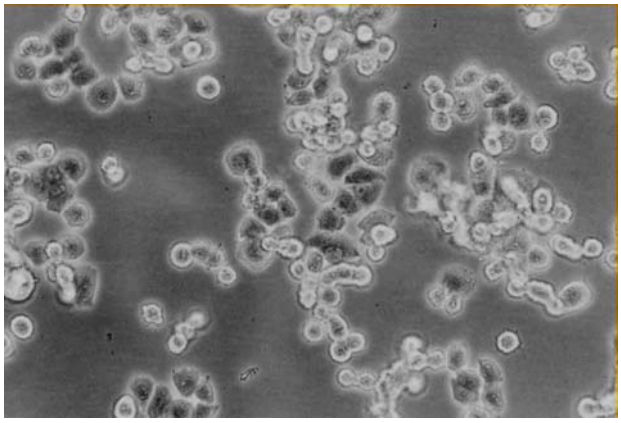


شکل ۱- شکل سلول‌های GH_3/B_6 در محیط کشت در روزهای اول پس از کشت. بزرگنمایی x۳۲.



شکل ۲- شکل سلولهای GH_3/B_6 پس از چسبیدن به کف فلاسک. بزرگنمایی x۳۲.

سرم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران باعث افـزایش زمان دو برابر شـدن سلولها در ابتـدای کار و سپس باعث توقف رشد سلولها و تغییر شکل ظاهری آنها شد. سلولـها از سطوحی که به آن چسبیده بودند جدا شده و معلق گردیـدند (شکل ۳).



شکل ۳- تغییر شکل سلولهای GH_3/B_6 در محیط کشت حاوی سرم تهیه شده ازدانشکده دامپزشکی. بزرگنمایی۳۲x.

در سرم شرکت HIMEDIA سلولها به وضعیت مطلوب بازگشتند و رشد و شکل ظاهری آنها به حالت طبیعی برگشت. این بررسی ها نشان دهنده حساس بودن سلولهای GH3/B6 به کیفیت سرم مورد استفاده برای آنها است.

بررسی اثر Hepes بر رشد و درصد سلول‌های زنده:

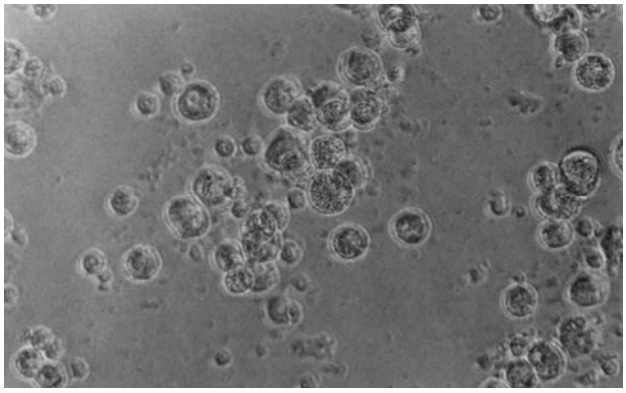
Hepes باعث تغییر شکل سلول‌ها و کاهش رشد آنها می‌شود. واکوئل-های درون سلولی شروع به تشکیل کرده و سـلولها کاملاً گرد می‌شوند، غشاء آنها گرانوله و تقسـیم و تکثیر سـلولها کاملاً متوقف می‌گردد و غشاء سلولها پاره می‌شود (شکل ۴).

اثر اسید پکتیک و TRH بر مورفولوژی و درصد بقا سلول‌های GH_3/B_6.

پس از بررسی شکل نمونه‌های حاوی TRH (غلظت ۵۰nM)، مشاهده شد که تعدادی از سلولها هنوز کاملاً مسطح هستند و تعدادی برای وارد شدن به فاز ترشحی شروع به جمع شدن می‌کنند. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌کنید تقسیم و تکثیر در این سلولها دیده می‌شود.

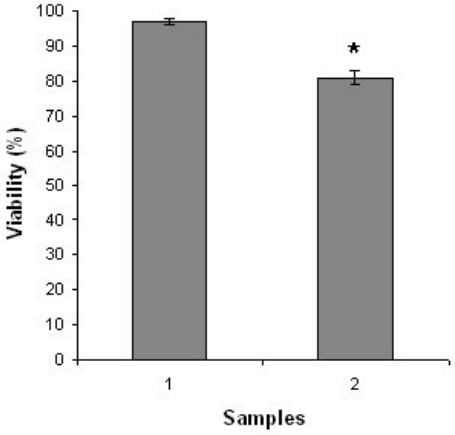
در نمونه‌های حاوی اسید پکتیک با غلظت ۲/۵ µg/ml سلولها برای وارد شدن بـه فـــاز تـرشحـی کاملاً خـود را جمـع نموده‌انـد و دیـگر بـه صورت مسـطح دیـــده نمی‌شوند (شکل ۷).

در نمونه‌های حاوی اسید پکتیک با غلظت ۱۰۰ µg/ml نیز، سلولها وارد فاز ترشحی می شوند و شکل آنها تغییرمی کند بدین ترتیب که کاملاً برجسـته شده و به صورت مسطح دیده نمی شوند (شکل ۸).

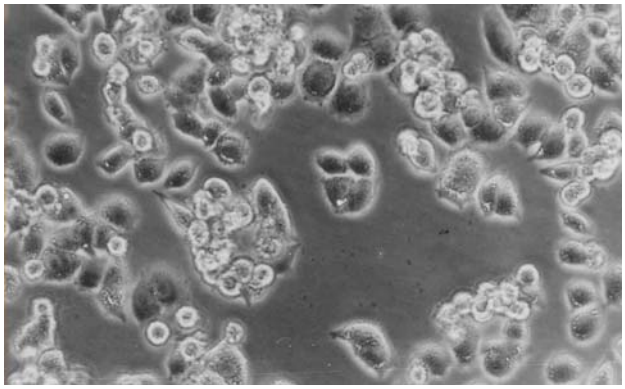


شکل ۴- شکل سلولهای GH_3/B_6 در محیط کشت حاوی Hepes. سلول‌ها گرد شده و غشاء آن‌ها گرانوله می‌شود. بزرگنمایی ۳۲x.

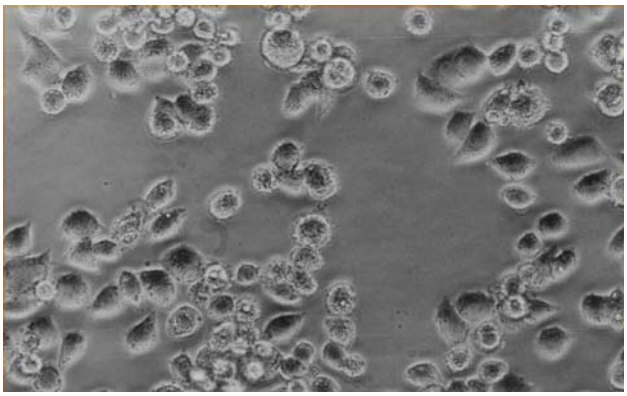
درصد سلولهای زنده برای نمونه‌های کشت داده شده در محیط حاوی Hepes تعیین شد که نسبت به گروه کنترل، درصد سلولهای زنده به طور معنی‌دار کاهش داشت (شکل ۵).



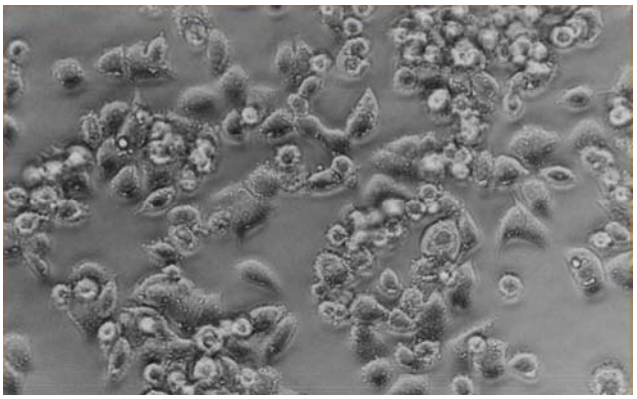
شکل ۵- درصد سلولهای زنده کشت داده شده در محیطHams'F12 حاوی Hepes (۳ بار تکرار).شامل: ۱- نمونه شاهد ۲- نمونه حاوی Hepes. درصد سلول‌های زنده به طور معنی دار کاهش داشت($P\leq0.05$).



شکل ۶- شکل سلولهای GH_3/B_6 در محیط کشت حاوی TRH. در این شکل سلول های نرمال و سلول‌هایی که وارد فاز ترشحی شده و تغییر شکل داده‌اند، مشاهده می‌گردد. بزرگنمایی ۳۲x.



شکل ۷- شکل سلولهای GH_3/B_6 در محیط کشت حاوی اسید پکتیک با غلظت ۲/۵ µg/ml. سلولها تغییر شکل داده و وارد فاز ترشحی شده‌اند. بزرگنمایی x۳۲.



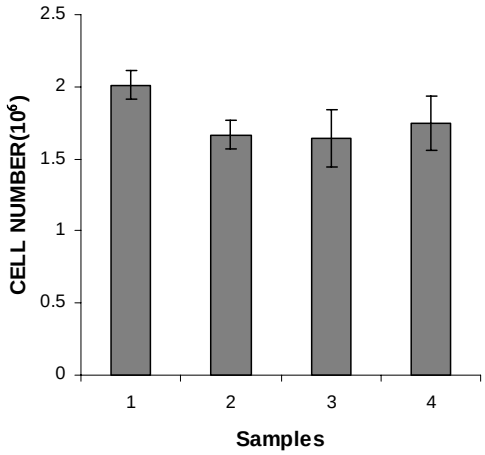
شکل ۸- شکل سلولهای GH_3/B_6 در محیط کشت حاوی اسید پکتیک با غلظت ۱۰۰ µg/ml. سلولها وزیکوله و ترشحی شده‌اند. بزرگنمایی x۳۲.

در نمونه‌های مورد مطالعه حاوی TRH (غلظت ۵۰nM)، اسید پکتیک با غلظت ۲/۵ µg/ml و اسید پکتیک با غلظت ۱۰۰ µg/ml تغییرات چشمگیری در کاهش یا افزایش در صد سلولهای زنده مشاهده نشد (شکل ۹).

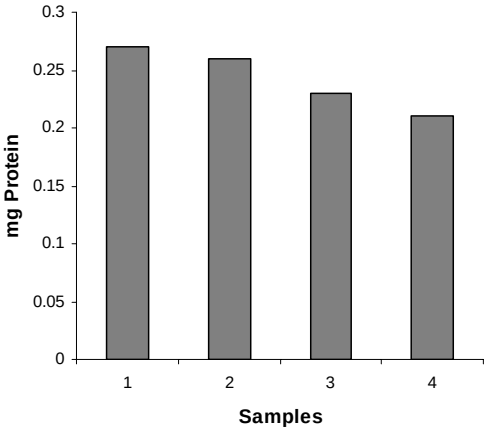
بررسی اثر اسیدپکتیک و TRH بر تعداد سلول و مقدار پروتئین کل سلوها:

تعداد سلول‌های شمارش شده در نمونه‌های حاوی TRH (غلظت ۵۰nM) و اسید پکتیک با غلظت‌های ۲/۵-۱۰۰ µg/ml بعد از شش روز، نسبت به نمونه شاهد تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (شکل ۱۰).

مقدار پروتئین اندازه گیری شده در نمونه حاوی اسید پکتیک با غلظت ۲/۵-۱۰۰ µg/ml و نمونه حاوی TRH (غلظت ۵۰nM) کاهش معنی داری نشان نداد (شکل ۱۱).



شکل ۱۰- تعداد سلول‌های شمارش شده بعد از شش روز (2 بار تکرار) شامل: ۱- نمونه شاهد ۲- نمونه حاوی TRH (غلظت ۵۰nM)، ۳- اسید پکتیک (غلظت ۲/۵ µg/ml) ۴- اسید پکتیک (غلظت ۱۰۰ µg/ml). تغییرات معنی-داری در کاهش یا افزایش تعداد سلولهای مشاهده نشد.



شکل ۱۱- مقایسه پروتئین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های: ۱- نمونه شاهد ۲- نمونه حاوی TRH (غلظت ۵۰nM)، ۳- اسید پکتیک (غلظت ۲/۵ µg/ml) ۴- اسید پکتیک (غلظت ۱۰۰ µg/ml). کاهش مقدار پروتئین در محیط‌های حاوی اسید پکتیک معنی‌دار نمی‌باشد.

بحث

عوامل مختلفی از جمله هورمونهای آزاد کننده و یا مهار کننده هیپوتالاموسی و یا هورمونهای بافتهای هدف غده هیپوفیز بر ترشح هورمونهای هیپوفیز اثر می‌گذارند و تاثیر این عوامل را می‌توان در شرایط"in vitro" از طریق انکوباسیون بافتی یا کشت اولیه سلولهای هیپوفیزی جدا شده از یکدیگر مورد مطالعه قرار داد. البته در نتایج حاصل از این آزمایشها به خاطر وجود تنوع سلولی هیپوفیز ابهاماتی وجود دارد. سلولهای مختلفی در هیپوفیز ترشح هورمون‌های

پرولاکتین، سوماتوتروپین، تیروتروپین، گنادوتروپین‌ها و هورمونهای گروه پرواپیوملانوکورتین را به عهده دارند.

نظر به اینکه بدست آوردن سلول‌های لاکتوتروپ خالص از هیپوفیز قدامی بسیار مشکل است بنابراین برای مطالعه این سلول‌ها از دودمان‌های سلولی کلون شده که توانایی ترشح هورمونهای هیپوفیزی را دارا هستند، استفاده گردید. دودمان‌های سلولی کلون شده باعث تولید جمعیت یکنواختی از سلولها می‌شوند و می‌توان آنها را به مقادیر زیاد تکثیر نمود.

دودمانسلولیGH_3 موش صحرایی و کلون تهیه شده از آن GH_3/B_6 هورمون پرولاکتین را ترشح می‌کنند (Bancroft & Tashjian 1971).

یکی از عوامل تنظیم کننده ترشح پرولاکتین توسط هیپوفیز TRH هیپوتالاموسی می‌باشد. مطالعات مختلف نیز بر روی تاثیر TRH بر تکثیر سلولی و ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH_3/B_6 هیپوفیزموش صحرایی صورت گرفته و نشان می‌دهد که TRH دارای اثر تحریکی به روی ترشح پرولاکتین توسط این سلولها می‌باشد (Brunet *et al.* 1981).

بررسی مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده در محیط‌های حاوی TRH به عنوان عامل محرک ترشح پرولاکتین نشان دهنده وارد شدن سلول‌ها به فاز ترشحی بود. مقایسه مورفولوژی سلول‌های انکوبه شده با TRH و اسید پکتیک نشان داد که اسید پکتیک نیز باعث وارد شدن سلول‌ها به فاز ترشحی شده و به عنوان یکی از عوامل محرک ترشح پرولاکتین می‌باشد. البته نمی‌توان تأثیر این دو غلظت مختلف بر نمونه‌ها را از هم تفکیک کرد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسید پکتیک می‌توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده نمود.

بررسی درصد سلولهای زنده کشت داده شده در محیطهای حاوی TRH و اسید پکتیک نشان دهنده بی ضرر بودن این مواد برای سلولها است. عدم تغییر تعداد سلول در نمونه‌های حاوی TRH و اسید پکتیک نسبت به نمونه شاهد نشان دهنده عدم تأثیر این مواد در کوتاه مدت بر تعداد سلول‌ها می‌باشد.

برای تعیین نحوه عمل اسید پکتیک بر سلول‌های GH_3/B_6 دو مکانیسم را می‌توان تصور کرد که باید در پژوهش‌های آینده آن را مد نظر قرار داد. یکی احتمال وجود گیرنده‌هایی برای اسید پکتیک در این سلول‌ها و دیگری مکانیسم تحریک مستقیم روی گرانول‌های ترشحی حاوی پرولاکتین که باعث آزاد شدن آن و بالا رفتن مقدار پرولاکتین در محیط کشت می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاون محترم و شورای پژوهشی پردیس علوم و معاون محترم و شورای پژوهشی دانشگاه تهران به دلیل کمک مالی و پشتیبانی از پژوهش در دانشگاه تهران قدردانی می‌شود. از سرکار خانم دانیل گرجی Danielle gourdji برای اهداء سلولها به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری سپاس و قدردانی می‌شود. از جناب آقای مهندس قبادیان که با اهداء برخی از وسایل آزمایشگاهی به پیشرفت این پژوهش کمک نموده اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

Avery B.j., Freeman M.E. 1992: Activity of vasoactive intestuinal peptide and serotonin in the paraventricular nucleus reflects the periodicity of the endogenous stimulatory rhytm regulatory prolactin secretion. *Endocrinolog.* **131:** 736-742.

Bancroft F.C., Tashjian A.H.jr. 1971: Growth in suspension culture of rat pituitary cells wich produce growth hormone and Prolactin. *Exp. Cell Res.* **64:** 125-128.

Ben-Jonathan N., Hnasko R. 2001: Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. *Endocrine Reviews.* **22:** 724-763.

Bowman C.M., Berger E.M., Butler E.N., Toth K.M., Repine J.E. 1985: HEPES may stimulate cultured endothelial cells to make growth-retarding oxygen metabolites. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **21:** 140-142.

Brunet N., Rizzino A., Gourdji D., Tixier-Vidal A. 1981: Effects of thyroliberin (TRH) on cell proliferation and prolactin secretion by GH3/B6 rat pituitary cells: a comparison between serum-free and serum-supplemented media. *J Cell Physiol.* **109:**363-372.

De Carvalho D.F., Silva K.L., de Oliveria D.A., Villa-Verde D.M., Coelho H.S., Silva L.C., Nasciutti L.E. 2000: Characterization and distribution of exteracellular matrix components and receptors in GH3B6 prolactin cells. *Biol. Cell.* **92:**351-362

Heaney A.P., Fernando M., Melmed S. 2002: Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **109:**277-83.

Heaney AP., Fernando M., Melmed S. 2004: Molecular targets in pituitary tumors. *Nat. Rev. Cancer.* **4:**285-295

Ishihara Y., Seom H., Suganuma N., Oguri H., Chihara K., Matsui N., Tomoda Y. 1991: Suckiling stimulates the expression of vasoactive intestinal peptide gene in rats. *Endocrinol Jpn.* **38:** 159-166.

Mallo F., Wilson E., Whorwood CB., Singh S., Sheppard M.C. 1995: Basic and acidic fibroblast growth factor increase prolactin mRNA in a dose-dependent and specific mnner in GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* **114:**117-125.

Martinez de la Escalera G., Weiner R.I. 1992: Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypotalamic regulation of prolactin secretion. *Endocr. Rev.* **13:**241-255.

Meucci O., Landolfi E., Scorziello A., Grimaldi M., Ventra C., Florio T., Avallone A., Schettini G. 1992: Dopamine and

Somatostatin inhibition of Prolactin secretion from MnQ Oituitary cells. *Enocrinol.* **131:** 1942- 1947.

Sawadogo L., Houdebine L.M., Thibault J.F., Rouau X., Ollivier-Bousquet M. 1988 (a): Effect of Pectic substances on Prolactin and Growth hormon secretion in the ewe and on the induction of Casein synthesis in the rat Reprod. *Nutr. Develop.* **28:** 293-30.

Sawadogo L., Houdebine L.M. 1988 (b): Induction of beta-casein synthesis in the mammary glands of rats treated with plant extracts. *C R Acad Sci III.* **306(4):**167-72.

Sepehri H., Renard C., Houdebine L.M. 1990: β-Glucan and Pectin derivatives stimulate secretion from hypophysis in vitro. *Pro soc Biol Exp Med.* **194:** 193-197.

Sepehri H. 1992: Pouvoir lactogene potentiel de quelques extratis de plantes iraniennes. *Cahi. Agricul.* **1:** 35-39.

Sepehri H., Zoraghi R., Haeri Rouhani A. 2000: Effect of pectic acid and β-glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants. *Iranian Int. J. Sci.* **1:** 99-109.

Tashjian A.H.J., Yasumura Y, Levine L, Sato G.H, Parker M.L. 1968: Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. Endocrinology. **82:** 342-52.

Tashjian A.H.J., Bancroft F.C., Leveine L. 1970: Production of both Prolactin and Growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue exteracts. *J. cell. Biol.* **47:** 61-70.

Zieger M.A., Glofcheski D.J., Lepock J.R., Kruuv J. 1991: Factors influencing survival of mammalian cells exposed to hypothermia. V. Effects of hepes, free radicals, and H2O2 under light and dark conditions. *Cryobiology.* **28:** 8-17.