

بیان متمایز دو واریانت مختلف Survivin در مراحل تکوینی فولیکول‌های تخمدانی موش

دکتر طاهره مازوچی*، دکتر مژده صالح نیا**، دکتر طاهره خامه چیان***

دریافت: ۸۷/۹/۲۲، پذیرش: ۸۸/۲/۹

چکیده:

مقدمه و هدف: سروایوین (Survivin) یکی از جدیدترین مهارکننده‌های آپوپتوزی است که بیان آن در بافت‌های جنینی و توموری که سرعت تقسیم بالایی دارند مشاهده شده است. هدف از انجام این پژوهش تعیین بیان متمایز واریانت‌های مختلف ژن سروایوین در مراحل مختلف تکوینی فولیکول‌های تخمدانی موش بود.

روش کار: مطالعه به روش تجربی بر روی موش‌های ماده سوری نابالغ ۱۲، ۱۶ و ۲۱ روزه نژاد NMRI انجام شد. جمع آوری فولیکول‌های تخمدانی در مراحل پره آنترال، پره آنترال بزرگ و آنترال به صورت جداگانه و به روش مکانیکی انجام شد. RNA کل از هر مجموعه فولیکولی به صورت جداگانه استخراج و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمر الیگو dt و آنزیم M-MuLV انجام شد. cDNA حاصل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای سروایوین و بتا ۲- میکروگلوبولین (به عنوان کنترل داخلی) طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تزیاید یافت. در نهایت بیان نیمه کمی رونوشت سروایوین در مراحل مختلف تکوینی با استفاده از آزمون post-hoc LSD تحت آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که سروایوین در مراحل مختلف تکوین فولیکول‌های تخمدانی بیان می‌شود. واکنش RT-PCR دو محصول تزیاید یافته را نشان داد که نشان‌دهنده بیان واریانت کوچک و بزرگتر سروایوین (۴۰ و ۱۴۰) در فولیکول‌های تخمدانی است. حداکثر بیان mRNA واریانت ۱۴۰ در فولیکول‌های پره آنترال مشاهده شد و با پیشرفت مرحله تکوین فولیکولی بیان آن کاهش نشان داد که این کاهش در مرحله پره آنترال بزرگ و آنترال معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بیان نیمه کمی واریانت ۴۰ در سه مرحله تکوین فولیکولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. واریانت دیگر (سروایوین ۱۲۱) در هیچکدام از مراحل تکوینی فولیکولی بیان نشد.

نتیجه نهایی: کاهش بیان سروایوین در مرحله آنترال نسبت به مراحل قبلی می‌تواند نشان‌دهنده نقش این واریانت در اترزی فولیکولی باشد. مقایسه سروایوین در مراحل مختلف تکوینی فولیکول‌های تخمدانی در سطح پروتئین پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه ها: آپوپتوز / تخمدان / تکوین فولیکولی / سروایوین

مقدمه:

فقط ۴۰۰ فولیکول در طول زندگی تولید مثلی یک زن تخمک‌گذاری و رها می‌شود. از آنجائی که فولیکول‌های کمی در تخمدان افراد یائسه دیده می‌شوند بنابراین بیش از ۹۹ درصد فولیکول‌های تخمدانی در طول زندگی تولید مثلی از طریق فرایندی به نام اترزی دژنره می‌شوند (۱). علی‌رغم وقوع زیاد این مرگ سلولی، حوادث مولکولی

در تخمدان انسان در زمان جنینی، تقریباً ۷ میلیون سلول زاینده (germ) وجود دارد که تعداد زیادی از آنها قبل از تولد از بین می‌روند. این مرگ سلولی بعد از تولد هم ادامه پیدا می‌کند تا این که در زمان بلوغ تقریباً به ۴۰۰۰۰۰ فولیکول در دو تخمدان می‌رسد. از این تعداد

* استادیار گروه بافت شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان (mazoochi_t@kaums.ac.ir)

** استاد گروه بافت شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

*** دانشیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

ما و همکاران بیان بیشتر سروایوین را در کارسینوماپی تلیالی تخمدانی نسبت به تومور خوش خیم و تخمدان طبیعی و همچنین ارتباط آن را با بیان Fas/FasL نشان دادند. براساس نتایج این مطالعه سروایوین در تخمدان طبیعی بیان نشده بود (۱۴).

در مطالعه جانسون (۱۵) بر روی سلولهای گرانولوزای مرغ، بیشترین سطح سروایوین در طول تکوین فولیکولی در سلولهای گرانولوزای فولیکولهای تمایز نیافته مشاهده شد. بیان آن در طول فاز G2/M میتوز افزایش نشان می‌داد. در کشت سلولهای گرانولوزای فولیکولی بیان سروایوین بعد از ۳ ساعت کاهش نشان داد که نشان‌دهنده این است که یا نیمه‌عمر آن کوتاه است و یا این که در نتیجه آپوپتوز mRNA آن تجزیه می‌شود یعنی سروایوین در فولیکولهای اترتیک کمتر بیان می‌شود. سؤال اینجاست که آیا کاهش در بیان سروایوین در طول مراحل اولیه اترزی و یا در طول انتقال به مرحله تمایز یافتگی یک علت مستقیم است و یا این که اثر فیزیولوژی تغییر یافته سلول می‌باشد.

در این مطالعه سعی شده است به دو سؤال پاسخ داده شود. یکی اینکه آیا سروایوین در تخمدان طبیعی بیان می‌شود و اگر جواب مثبت است آیا میزان بیان واریانتهای مختلف آن در طی تکوین فولیکولهای تخمدانی متفاوت است؟ به عبارتی دیگر با توجه به اینکه اترزی فولیکولی وابسته به مرحله تکوینی فولیکول است آیا بین بیان واریانتهای مختلف سروایوین و اترزی فولیکولی ارتباطی وجود دارد؟

روش کار:

نمونه گیری از موش: از آنجائیکه در تخمدان پستانداران درست پس از تولد اولین موج رشد فولیکولی شروع میشود، در روزهای مختلف قبل از بلوغ میتوان جمعیت هموزنوسی از فولیکولها را بدست آورد (۱۶). بهمین علت در این مطالعه تجربی به منظور دسترسی به تعداد زیادی از فولیکولها در مرحله‌های مشابه، از موش‌های نابالغ استفاده شد. موشهای سوری نابالغ نژاد NMRI با سن ۱۲، ۱۶ و ۲۱ روزه به روش قطع نخاع گردنی نخاعی شدند. با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدانهای آنها از بدن خارج و در قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت MEM- α حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum) قرار داده شدند. جهت جداسازی فولیکولهای تخمدانی از

آن هنوز به خوبی مشخص نشده است. مطالعات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص کرده است که مرگ سلولهای زاینده و سوماتیک در تخمدان به وسیله آپوپتوز انجام می‌شود (۴-۲). همچنین مشخص شده است که آپوپتوز در همه مراحل تکوین فولیکولی به وقوع می‌پیوندد اما بیشتر فولیکولها موقعی که به مرحله ابتدای آنترال در جوندگان و آنترال در انسان رسیدند دچار آپوپتوز می‌شوند، مگر این که به وسیله گنادوتروپینها (اساسا FSH) از مرگ رهایی یابند (۵).

اگرچه مکانیسم داخلی آپوپتوز در گونه‌های مختلف حفاظت شده است، اما سلولهای مختلف مسیرهای متفاوتی برای آپوپتوز طی می‌کنند. چندین ژن به عنوان عاملان اصلی در حفظ و یا مرگ فولیکولهای تخمدانی پیشنهاد شده‌اند (۱۰-۶). محصول این ژن‌ها پروتئین‌هایی هستند که یا در پیشبرد فرایند (Pro-Apoptotic) و یا در مهار آن (Anti-Apoptotic) عمل می‌کنند.

سروایوین یکی از اعضای خانواده پروتئینهای مهار کننده آپوپتوز است که در حال حاضر بیشترین توجه به آن معطوف شده است. ژن آن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ در جایگاه ۲۵ قرار دارد که بیان آن منجر به کد شدن پروتئینی با ۱۴۲ اسید آمینه می‌شود. سروایوین برخلاف سایر پروتئینهای مهار کننده آپوپتوز که دارای بخش حلقه مانند در انتهای کربوکسیل خود هستند در این قسمت دارای بخش مارپیچی α -helix است که شبیه آن در پروتئینهای مرتبط به میکروتوبولها (Microtubule Associated Proteins) وجود دارد و با این بخش خود با انتهای C توبولین واکنش می‌دهد. بدین ترتیب به میکروتوبولهای دوک تقسیم متصل شده و از آبشار آپوپتوتیک جلوگیری می‌کند. همچنین برخلاف سایر پروتئینهای مهار کننده آپوپتوز که در بافتهای بالغ یافت می‌شوند فقط در بافتهای جنینی و در تعدادی از بافتهای بالغ مثل جفت، تیموس و بیضه دیده شده است. بیان زیاد سروایوین در بیشتر سرطانهای انسان مثل آدنوکارسینوما ریه، پانکراس، پروستات و کارسینوما سلولهای سنگفرشی ریه دیده شده است. بنابراین به عنوان نشانگر توموری جدیدی مورد توجه قرار گرفته است (۱۱، ۱۲).

ترینگلر و همکاران بیان سروایوین را با روش ایمنو هیستوشیمی در تومورهای خوش خیم و بدخیم تخمدان نشان دادند (۱۳).

روش مکانیکی استفاده شد. این کار با استفاده از نوک سوزن ۲۹G متصل به سرنگ انسولین ۱ میلی لیتری زیر بزرگنمایی ۲۵ میکروسکوپ استریو (Olympus, Japon) انجام گرفت. فولیکول‌های مورد مطالعه فولیکول‌های پره آنترال (با قطر ۱۰۰-۱۲۰ میکرومتر) جدا شده از تخمدان موش در سن ۱۲ روز، فولیکول‌های پره آنترال بزرگ (با قطر ۳۰۰ میکرومتر) جدا شده از تخمدان موش در سن ۱۶ روز و فولیکول‌های آنترال (با قطر ۴۵۰ میکرومتر و بیشتر) جدا شده از تخمدان موش در سن ۲۱ روز بود. قطر فولیکول‌ها با تعیین میانگین دو قطر عمود بر هم آنها و برحسب میکرومتر و با استفاده از میکروسکوپی که دارای عدسی چشمی کالبره شده بود انجام شد.

بررسی بیان سروایوین به روش RT-PCR نیمه کمی: به منظور بررسی بیان واریانت‌های مختلف ژن سروایوین در مراحل مختلف تکوین فولیکول‌ها از روش RT-PCR نیمه کمی (Semi- quantitative Reverse Transcription- polymerase chain Reaction) استفاده شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy Minikit (Qiagen, USA Cat. No. 74104) و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. تمامی ظروف و پیپت‌های مورد استفاده عاری از آنزیم RNase شدند: ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۰/۱ درصد Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma; 065k 3688) قرار داده شدند. سپس وسایل ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵psi اتوکلاو شدند تا DEPC از بین برود. مراحل استخراج RNA زیر هود که نیم ساعت قبل از آن با UV استریل شده بود انجام گرفت. به منظور از بین بردن احتمالی آلودگی با DNA، از آنزیم DNase عاری از RNase استفاده شد. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

پس از اطمینان از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن بوسیله کیت (Fermentas, Lot: 00014995) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۵ میکروگرم RNA استخراج شده ۱ میکرولیتر Oligo dt (۰/۵ میکروگرم) اضافه شد. حجم نهایی این مرحله با آب تیمار شده با DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس بلافاصله به یخ منتقل شد. به میکروفیوژ ۴ میکرولیتر بافر ۵x، مخلوط dNTP ۰/۲ میلی مولار، ۰/۵

میکرولیتر RNasin (Fermentas; 40U/μl) و ۱/۵ میکرولیتر آب دیونیزه تیمار شده با DEPC اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرولیتر برسد. پس از قرار دادن محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۱۰ میکرولیتر آنزیم RT (M-MuLV Reverse Transcriptase; 200U) به واکنش اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه شد. با قرار دادن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد، واکنش متوقف می‌شد. cDNA حاصل روی یخ قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت انجام واکنش PCR از کیت Taq DNA Polymerase, Roche Germany; Cat. No. 1 596 594 استفاده شد.

از آن جهت که برای سروایوین موشی تا کنون ۳ واریانت ۱۴۰، ۱۲۱ و ۴۰ گزارش شده است به منظور بررسی بیان هر ۳ واریانت، از یک پرایمر بالادست و دو پرایمر پایین دست استفاده شد (۱۷). در صورت بیان هر ۳ واریانت سروایویندر نمونه‌ها، انتظار می‌رفت محصول PCR پرایمر پایین دست اول، واریانت اول و سوم سروایوین را یعنی باند های ۲۵۴ و ۱۴۴ جفت بازی را نشان دهد. همچنین استفاده از پرایمر پایین دست دوم در واکنش PCR واریانت دوم سروایوین را تکثیر می‌نماید که تولید باند ۳۳۲ جفت بازی را می‌نماید. واکنش طبق برنامه در ۳۰ سیکل توسط دستگاه Thermal cycler (Biorad) صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده با شماره دست‌یابی AF 115517 به این ترتیب بود:

پرایمر بالادست:

5'ACGCCACCTTCAAGAACTGGCCCTTCTGGA 3'

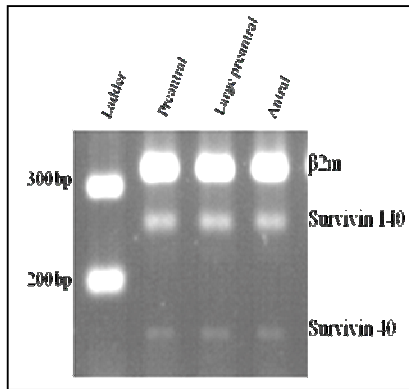
پرایمر پایین دست ۱:

5'GTTTCAAGAATTCAGTAVGGTTAGTTCTT 3'

پرایمر پایین دست ۲: 5' GGCTTCTGACAATGCTTG 3'

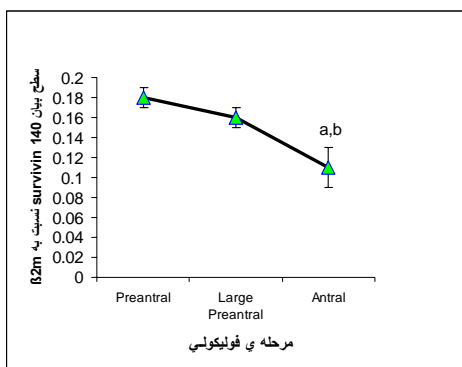
شرایط PCR به این صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، امتداد رشته دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیه و امتداد نهایی دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. همچنین از ژن Beta-2 microglobulin (β_2m) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. بدین منظور در هر تیوب PCR

۴۰ ژن سرئایوین یعنی باند ۲۵۴ bp و ۱۴۴ درهمه گروه‌های مورد بررسی بیان شده است. درحالیکه عدم مشاهده باند ۳۳۲ جفت بازی درهمه گروه‌ها نشاندهنده این است که سرئایوین ۱۲۱ در هیچکدام از مراحل فولیکولی مورد بررسی بیان نمی‌شود.



شکل ۲. بیان mRNA دو واریانت از ژن سرئایوین در مراحل تکوینی مختلف فولیکول‌های تخمدانی موش

با مقایسه شدت باند سرئایوین ۱۴۰ به $\beta 2m$ در گروه‌های مختلف مشخص شد که حداکثر میزان بیان این ژن در فولیکول‌های پره‌آنترال مشاهده می‌شود. آنالیز آماری بیان نسبی سرئایوین ۱۴۰ در گروه‌های مختلف مشخص کرد که تفاوت مشاهده شده بین فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ با آنترال و همچنین پره‌آنترال با آنترال معنی دار بود ($p < 0.05$) (نمودار ۱). درحالیکه بین بیان نسبی سرئایوین ۱۴۰ در فولیکول‌های پره‌آنترال با پره‌آنترال بزرگ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



نمودار ۱: بیان نیمه‌کمی ژن سرئایوین ۱۴۰ در مراحل مختلف تکوین فولیکولی

a: اختلاف معنی دار با فولیکول پره‌آنترال ($p = 0.001$)

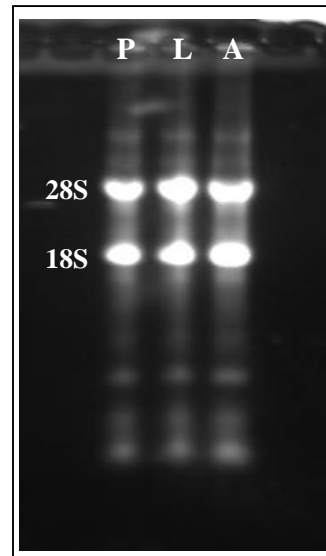
b: اختلاف معنی دار با فولیکول پره‌آنترال بزرگ ($p = 0.001$)

به مقدار یکسان از پرایمرهای بالادست و پایین‌دست ژن سرئایوین و همچنین پرایمرهای بالادست و پایین‌دست ژن $\beta 2m$ (۱۰ پیکومولار) ریخته شد. محصول PCR با ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد. جهت مشخص نمودن محل باندهای ظاهر شده بر روی ژل از ladder (100bp, Fermentas, Lot: 00014815) استفاده شد.

روش‌های آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات: پس از اسکن ژل‌ها، شدت هر باند با استفاده از نرم‌افزار Uvitec (Total Lab, Version 10, Newcastle, UK) محاسبه گردید. واکنش RT-PCR با شرایط یکسان حداقل ۳ بار تکرار شد. در نهایت مقدار نسبی بیان هر واریانت از ژن، بوسیله محاسبه میانگین نسبت شدت باند مربوط به ژن سرئایوین به شدت باند $\beta 2m$ مربوط به آن تعیین شد و نتایج با استفاده از آزمون Post-hoc LSD تحت آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج:

در بررسی ژل الکتروفورز RNA به‌دست آمده دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) به وضوح قابل رؤیت بود که مؤید عدم تجزیه RNA بود (شکل ۱).

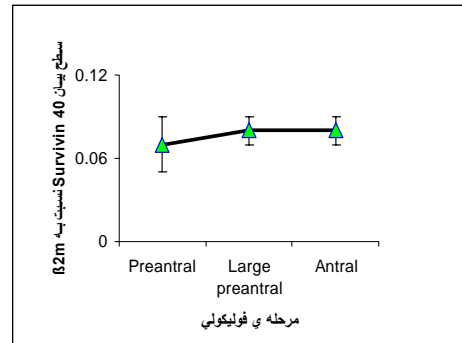


شکل ۱. ژل الکتروفورز RNA استخراج شده در فولیکول‌های تخمدانی: (P) پره‌آنترال، (L) پره‌آنترال بزرگ و (A) آنترال حضور باند های ۱۸S و ۲۸S واضح و همچنین حداقل اسمیر، نشاندهنده سالم و دست نخورده بودن RNA می باشد.

همچنین نسبت به‌دست‌آمده A_{260}/A_{280} بین ۱/۸ و ۲ نشاندهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز عدم آغشتگی آن با پروتئین و DNA ژنومی بود.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود واریانت ۱۴۰ و

مقایسه شدت باند سروایوین ۴۰ به $\beta 2m$ در گروه‌های مختلف مشخص کرد که بین بیان این واریانت از ژن در مراحل مختلف تکوینی فولیکول‌های تخمدانی موش تفاوت معنی داری وجود ندارد (نمودار ۲).



نمودار ۲: بیان نیمه کمی ژن سروایوین ۴۰ در مراحل مختلف تکوین فولیکولی

بین گروه‌ها اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p > 0.05$)

بحث:

در مطالعه حاضر بیان ژن سروایوین در فولیکول‌های تخمدانی موش در مراحل مختلف تکوینی شامل پره آنترال، پره آنترال بزرگ و آنترال مقایسه شد. ژن سروایوین یک عضو خانواده پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز است که نقشی دو گانه در تنظیم تقسیم سلولی و نیز مهار آپوپتوز دارد (۱۲).

از میان ۳ واریانت سروایوین در این مطالعه واریانت ۱۴۰ و ۴۰ این ژن بیان شده بود که از این میان شدت بیان سروایوین ۱۴۰ بیشتر از واریانت دوم بود. حداکثر بیان mRNA واریانت ۱۴۰ در فولیکول‌های پره آنترال مشاهده شد و با پیشرفت مرحله تکوین فولیکولی بیان آن کاهش نشان داد. اگرچه بیان سروایوین ۱۴۰ در فولیکول‌های پره آنترال با فولیکول‌های پره آنترال بزرگ تفاوتی نداشت اما در فولیکول‌های پره آنترال با آنترال و فولیکول‌های پره آنترال بزرگ با آنترال این کاهش معنی دار بود.

با توجه به اینکه پروتئین سروایوین یک پروتئین مهار کننده آپوپتوز است انتظار این تغییر در بیان سروایوین ۱۴۰ می‌رفت. چرا که بر اساس مطالعات قبلی اثرزی فولیکولی وابسته به مرحله تکاملی است. بر اساس این مطالعات بیشتر فولیکول‌ها موقعی که به مرحله ابتدای آنترال در جوندگان و آنترال در انسان رسیدند دچار آپوپتوز می‌شوند مگر این که به وسیله گنادوتروپین‌ها (اساساً FSH) از

مرگ رهایی یابند (۳-۱). یعنی در صورت داشتن ارتباط مستقیم بیان سروایوین ۱۴۰ با آپوپتوز فولیکولی، باید در مرحله آنترال کمتر از مراحل قبلی بیان شود که این تفاوت سطح در فولیکول‌ها مشاهده شد. بدین ترتیب می‌توان این احتمال را داد که سروایوین ۱۴۰ فولیکول‌های تخمدانی را از آپوپتوز محافظت می‌کند.

مطالعات کمی در رابطه با بیان، تنظیم و عمل این پروتئین در فولیکول‌های تخمدان در طی تکامل طبیعی وجود دارد. بیان پروتئین سروایوین بیشتر در بافت‌های جنینی و سرطانی مشاهده شده است (۱۵، ۱۸، ۱۹). کاوامورا و همکاران در تحقیق خود سروایوین را در جنین موش قبل از لانه‌گزینی مشاهده کردند. آنها نقش سروایوین را به عنوان یک عامل محافظتی جنین از آپوپتوز بوسیله مهار مسیرهای آپوپتوتیک اعلام کردند (۲۰). مشاهده شده است که بیان سروایوین در بیماران با سرطان تخمدان بیشتر از بیماران با تومور خوش خیم تخمدان و آنها هم بیشتر از تخمدان طبیعی است (۱۴).

در جوجه سروایوین در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تمایز نیافته بیشتر از تمایز یافته بود. کاهش بیان سروایوین در سلول‌های گرانولوزای کشت داده شده بعد از ۳ ساعت مشاهده شد که نشان دهنده دو چیز می‌باشد: نیمه عمر کوتاه و یا تجزیه mRNA آن در نتیجه آپوپتوز (۱۵). بیان واریانت‌های ۱۴۰ و ۴۰ ژن سروایوین در فولیکول‌های کشت داده شده تخمدان موش انجمادی و غیر انجمادی مشاهده شده است (۲۱). در مطالعه کامازاوا و همکاران (۲۲) با استفاده از RT-PCR بیان دو واریانت ۱۴۰ و ۴۰ ژن سروایوین در سلول‌های گرانولوزا-لوتئینی موش و انسان نشان داده شد که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. واریانت سوم سروایوین تنها در سلول‌های گرانولوزا-لوتئینی انسان مشاهده شد. رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی تخمدان موش نابالغ بیان سروایوین را در سلول‌های گرانولوزا و تخمک در همه مراحل تکوین فولیکولی نشان داد. تخمک با شدت بیشتری رنگ گرفته بود که نشان دهنده بیان بیشتر سروایوین در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های گرانولوزا است.

واریانت ۴۰ ژن سروایوین در همه گروه‌ها تقریباً یکسان بیان شده بود و اختلاف بین گروه‌ها معنی دار نبود. نقش این واریانت از سروایوین هنوز مشخص نیست. احتمالاً از آنجاکه سروایوین ۴۰ دامین پایانه N را دارد

- primary follicle transition in the mouse ovary. *Fertil Steril* 2005;83:410-8.
8. Nandedkar T, Dharma S, Modi D, Dsouza s. Differential gene expression in transtition of primordial to preantral follicles in mouse ovary. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;63:57-67.
 9. Yoon SJ, Kim KH, Chung HM, Choi DH, Lee WS, Cha KY, et. al. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertil Steril* 2006;85:193-203.
 10. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008;90:1480-86.
 11. Liguang Z, Peishu L, Hongluan M, Hong J, Rong W, Wachtel MS, et al. Survivin expression in ovarian cancer. *Exp Oncol* 2007;29:121-25.
 12. Kumazawa Y, Kawamura K, Sato T, Sato N, Konishi Y, Shimizu Y, et al. HCG up-regulates survivin mRNA in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod Adv* 2005; 11:161-166.
 13. Tringler B, Lehner R, Shroyer Al, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of survivin in serous tumor ovary. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:40-3.
 14. Ma XY, He FX, Wu SF, Lu YP, Ma D. Expression of survivin in ovarian epithelial carcinoma and its correlation with expression of Fas and FasL. *Ai Zheng* 2004;23:173-76.
 15. Johnson AL, langer JS, Bridgham JT. survivin as a cell cycle - related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3405-13.
 16. MacGee EA, Hsu SY, Kaipia A, Hsueh AJW. Cell death and survival during ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 15-18.
 17. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, De-Baere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, et al. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteions with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 2000;95:1435-42.
 18. McKay T, Bell S, Tenev T, Stoll V, Lopes R, Lemoine NR, et. al. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003; 22:3539-47.
 19. Kleinberg L, Florenes V, Silins I, Haug K, Trope C, Nesland J, Davidson B. Nuclear expression of survivin is associated with improved survival in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer* 2007; 109: 228-238.
 20. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*

ممکن است با اشکال دیگر سرئوایوین دایمرهایی تشکیل می‌دهد و بنابراین عملکرد کلی اشکال دیگر سرئوایوین را تنظیم و تعدیل می‌نماید.

برای تمایز بین سرئوایوین ۱۴۰ و سرئوایوین ۱۲۱ از یک پرایمر پایین دست دوم که مکمل توالی موجود بر روی اینترون شماره ۳ است استفاده شد (۱۶). این پرایمر تنها قادر به تکثیر سرئوایوین ۱۲۱ می‌باشد و واریانت‌های دیگر سرئوایوین که فاقد این قطعه در رونوشت خویش هستند، تکثیر نمی‌شوند. بکارگیری این پرایمر هیچگونه محصولی را تکثیر نکرد که نشاندهنده عدم بیان واریانت ۱۲۱ ژن سرئوایوین در طی تکامل فولیکول‌های تخمدانی بود که با یافته‌های کامازاوا و همکاران همخوانی دارد.

نتیجه نهایی:

در این مطالعه بیان نیمه کمی ژن سرئوایوین در سطح mRNA بررسی شد. از آنجا که عملکرد این ژن ها وقتی مشخص می شود که پروتئین آنها تغییر یابد و ممکن است سطح بیان ژن زیاد و یا کم شده باشد اما در سطح پروتئین تغییری مشاهده نشود، بررسی و مقایسه پروتئین های مرتبط با آپوپتوز فولیکولی پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری:

این طرح نتیجه اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی کاشان به شماره ۸۵۱۹ بوده که بدین وسیله از مساعدت و همکاری کلیه دست‌اندرکاران حوزه پژوهشی این دانشگاه سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

1. Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78:185-201.
2. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Anna Rev Physiol* 1997;59:349-63.
3. Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 2003;8:222-37.
4. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase- mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 2002;124:19-27.
5. Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiol Rev* 2000;80:593-614.
6. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78:135-63.
7. Park CE, Cha KY, Kim K, Lee KA. Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-

- 2003; 256, 331-341.
21. Mazoochi T, Salehnia M, Pourbeiranvand SH, Forouzandeh M, Mowla SJ, Hajizadeh E. Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrified and non-vitrified ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009;15, 155-164.
22. Kamazawa Y, Kawamura K, Sato T, Sato N, Konishi Y, et al. HCG up-regulates survivin mRNA in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2005;11(3):161-166.