مقاله پژوهشی

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 پلیمراز تزاید 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 تزاید یافته را نشان داد که نشاندهنده بیان واریانت کوچک و بزرگتر سروایوین (٤٠ و ١٤٠) در فولیکولهای تخمدانی است. حداکثر بیان mRNA واریانت ١٤٠ در فولیکول‌های پره آنترال مشاهده شد و با پیشرفت مرحله تکوین فولیکولی بیان آن کاهش نشان داد که این کاهش در مرحله پره‌آنترال بزرگ و آنترال معنی‌دار بود ($P<0/05$). بیان نیمه کمی واریانت ٤٠ در سه مرحله تکوین فولیکولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. واریانت دیگر (سروایوین۱۲۱) 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 می شود.

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

مقدمه :

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 می رسد. از این تعداد 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

* 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

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 می پیوندد 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 اسیدآمینه 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 آدنوکارسینومای ریه، پانکراس ، پروستات و کارسینومای 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 ایمنوهیستوشیمی در تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تخمدان نشان دادند(۱۳).

ما و همکاران بیان بیشتر سروایوین را در کارسینومای اپی‌تلیالی 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 تمایزیافتگی 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: ازآنجائیکه در تخمدان پستانداران درست پس از تولد اولین موج رشد فولیکولی شروع میشود، در روزهای مختلف قبل از بلوغ میتوان جمعیت هموژنوسی از فولیکولها را بدست آورد(۱۶). بهمین علت دراین مطالعه تجربی به منظور دسترسی به تعداد زیادی از فولیکول‌ها در مرحله‌ای مشابه، از موش‌های نابالغ استفاده شد. موشهای سوری نابالغ نژاد NMRI با سن۱۲، ۱۶ و۲۱ روزه به روش قطع نخاع گردنی نخاعی شدند. با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم تخمدان های آنها از بدن خارج و در قطرات ۲۰۰ میکرولیتری محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum) قرار داده شدند. جهت جداسازی فولیکول های تخمدانی از

روش مکانیکی استفاده شد. این کـار بـا اسـتفاده از نـوک سوزن ۲۹G متصل به سرنگ انسولین ۱ میلی لیتری زیـر بزرگنمایی ۲۵ میکروسـکوپ اسـتریو (Olympus, Japon) انجام گرفت. فولیکول‌های مورد مطالعه فولیکول های پـره آنترال (با قطر ۱۰۰-۱۲۰ میکرومتر) جدا شده از تخمدان موش در سن ۱۲ روز، فولیکـول هـای پـره آنتـرال بـزرگ (با قطر ۳۰۰ میکرومتر) جدا شده از تخمدان موش در سن ۱۶ روز و فولیکول های آنترال (با قطـر ۴۵۰ میکرومتـر و بیشتر) جدا شده از تخمـدان مـوش در سـن ۲۱ روز بـود. قطر فولیکول‌ها با تعیین میانگین دو قطر عمود بر هم آنها و برحـسب میکرومتـر و بـا اسـتفاده از میکروسـکوپی کـه دارای عدسی چشمی کالبیره شده بود انجام شد.

بررسی بیان سروایوین به روش RT-PCR نیمه کمی: به منظـور بررسی بیان واریانت‌های مختلف ژن سروایوین در مراحـل مختلـف تکـوین فولیکـول هـا از روش RT-PCR نیمـه کمـی-(Semi- quantitative Reverse Transcription polymerase chain Reaction) اسـتفاده شـد. ابتـدا اسـتخراج RNA بـا اسـتفاده از کیـت RNeasy Minikit (Qiagen,USA Cat. No.74104) و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. تمامی ظروف و پیپـت‌هـای مـورد اسـتفاده عاری از آنزیم RNase شدند: ابتدا به مـدت ۲۴ سـاعت در محلـول ۰/۱ درصـدDiethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma; 065k 3688) قرار داده شدند. سپس وسـایل ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵psi اتوکلاو شدند تا DEPC از بین برود. مراحل استخراج RNA زیر هود که نیم ساعت قبـل از آن با UV استریل شده بود انجـام گرفـت. بـه منظـور از بـین بردن احتمالی آلودگی با DNA، از آنزیم DNase عـاری از RNase استفاده شد. RNA استخراج شده از نظـر کمـی و کیفی با دو روش UV اسـپکتروفتومتری و الکتروفـورز بـر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

پس از اطمینان از خلـوص RNA، سـاخت cDNA از روی آن بوسیله کیت (Fermentas, Lot: 00014995) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. بدین ترتیب که بـه ۵ میکروگرم RNA اسـتخراج شـده ۱ میکرولیتـر Oligo dt (۰/۵ میکروگرم) اضافه شد. حجم نهایی این مرحله بـا آب تیمـار شـده بـا DEPC بـه ۱۱ میکرولیتـر رسـانده شـد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس بلافاصله به یخ منتقل شـد. بـه میکروفیـوژ ۴ میکرولیتر بافر ۵x، مخلوط dNTP ۰/۲ میلـی 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 محلـول واکـنش به‌مدت۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد،۱ میکرولیتر آنـزیم RT (M-MuLV Reverse Transcriptase; 200U) به واکنش اضافه شد و بـه مـدت ۱ سـاعت در ۴۲ درجـه سانتیگراد انکوبه شد. با قرار دادن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در۷۰ درجه سـانتیگراد، واکـنش متوقـف مـی‌شـد. cDNA حاصل روی یخ قـرار داده شـد و تـا زمـان انجـام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جهـــت انجـــام واکـــنش PCR از کیـــت Taq DNA Polymerase,Roche Germany; Cat. No. 1 596 594 استفاده شد.

از آن جهت که بـرای سـروایوین موشـی تـا کنـون ۳ واریانـت۱۴۰، ۱۲۱ و۴۰ گـزارش شـده اسـت بـه منظـور بررسی بیان هر ۳ واریانـت، از یـک پرایمـر بالادسـت و دو پرایمر پایین دست استفاده شد(۱۷). در صورت بیان هر ۳ واریانت سروایویندر نمونه ها، انتظار مـی رفـت محـصول PCR پرایمر پایین دست اول، واریانت اول و سوم سروایوین را یعنی باند های ۲۵۴ و ۱۴۴ جفت بازی را نـشان دهـد. همچنین استفاده از پرایمر پـایین دسـت دوم در واکـنش PCR واریانت دوم سروایوین را تکثیر می نماید کـه تولیـد باند ۳۳۲ جفت بازی را می نماید. واکنش طبق برنامـه در ۳۰ سـیکل توسـط دسـتگاه Thermal cycler (Biorad) صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده با شماره دست‌یابی AF 115517 به این ترتیب بود:

پرایمربالادست :

5'ACGCCACCTTCAAGAACTGGCCCTTCCTGGA 3'

پرایمرپایین دست۱ :

5'GTTTCAAGAATTCACTGAVGGTTAGTTCTT 3'

پرایمرپایین دست۲ : 5' GGCTTCTGACAATGCTTG 3'

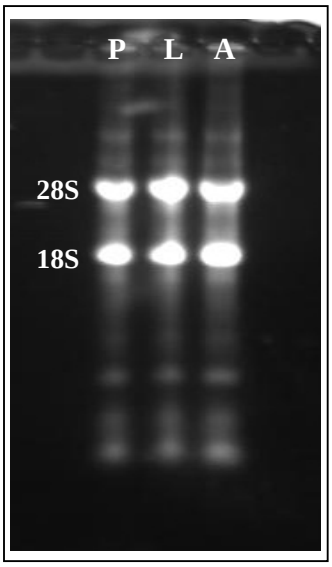
شرایط PCR به این صورت بود که دناتوراسـیون اولیـه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسـیون دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیـه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مـدت ۴۵ ثانیـه، امتـداد رشته دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیـه و امتـداد نهـایی دمـای ۷۲ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت۱۰ دقیقـه. همچنین از ژن Beta-2 microglobolin (β_2m) بـه عنـوان کنترل داخلی استفاده شد. بدین منظور در هر تیوب PCR

به مقدار یکسان از پرایمرهای بالادست و پایین‌دست ژن سروایوین و همچنین پرایمرهای بالادست و پایین‌دست ژن β_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 باشرایط یکسان حداقل۳ بار تکرار شد. در نهایت مقدار نسبی بیان هر واریانت از ژن، بوسیله محاسبه میانگین نسبت شدت باند مربوط به ژن سروایوین به شدت باندβ_2m مربوط به آن تعیین شد و نتایج با استفاده از آزمون Post-hoc LSD تحت آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج :

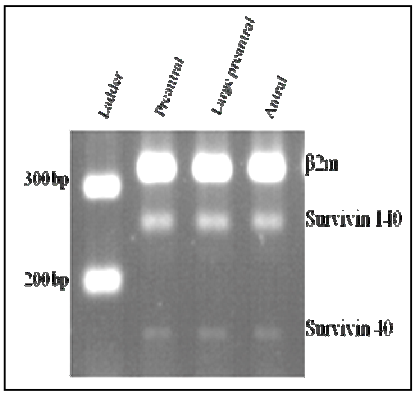
در بررسی ژل الکتروفورز RNAی به‌دست آمده دو باند ۱۸S و۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) به وضوح قابل رؤیت بود که مؤید عدم تجزیهRNA بود (شکل ۱).



شکل ۱. ژل الکتروفورز RNA استخراج شده در فولیکول های تخمدانی: (P) پره‌آنترال، (L) پره‌آنترال بزرگ و (A) آنترال
حضور باند های ۱۸S و۲۸S واضح و همچنین حداقل اسمیر، نشاندهنده سالم و دست نخورده بودن RNA می باشد.

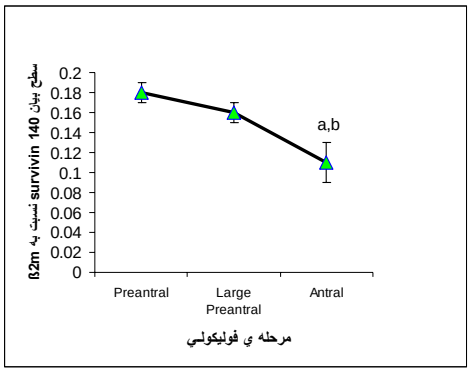
همچنین نسبت به‌دست‌آمده A_{260}/A_{280} بین ۱/۸ و۲ نشاندهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز عدم آغشتگی آن با پروتئین و DNAی ژنومی بود.

همانطور که در شکل۲ مشاهده می شود واریانت۱۴۰ و ۴۰ ژن سروایوین 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 سروایوین ۱۲۱ در هیچکدام از مراحل فولیکولی مورد بررسی بیان نمی‌شود.



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

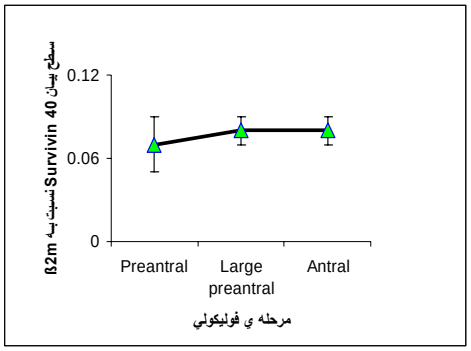
با مقایسه شدت باند سروایوین ۱۴۰ به β2m در گروه های مختلف مشخص شد که حداکثر میزان بیان این ژن در فولیکول های پره‌آنترال مشاهده می‌شود. آنالیز آماری بیان نسبی سروایوین ۱۴۰ در گروه های مختلف مشخص کرد که تفاوت مشاهده شده بین فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ با آنترال و همچنین پره‌آنترال با آنترال معنی دار بود ($p<۰/۰۵$) (نمودار۱). درحالیکه بین بیان نسبی سروایوین ۱۴۰ در فولیکول‌های پره‌آنترال با پره‌آنترال بزرگ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



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

a:اختلاف معنی دار با فولیکول پره‌آنترال ($p=۰/۰۰۱$)
b: اختلاف معنی دار با فولیکول پره‌آنترال بزرگ ($p=۰/۰۱$)

مقایسه شدت باند سروایوین ۴۰ به β2m در گروههای مختلف مشخص کرد که بین بیان این واریانت از ژن در مراحل مختلف تکوینی فولیکول‌های تخمدانی موش تفاوت معنی داری وجود ندارد (نمودار۲).



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

بین گروه‌ها اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$)

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 سروایوین140 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 پره‌آنترال با فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ تفاوتی نداشت اما در فولیکول‌های پره‌آنترال با آنترال و فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ با آنترال این کاهش معنی‌دار بود.

با توجه به اینکه پروتئین سروایوین یک پروتئین مهار کننده آپوپتوز است انتظار این تغییر در بیان سروایوین۱۴۰ می‌رفت. چرا که بر اساس مطالعات قبلی اترزی 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 فولیکول ها 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 آنهم 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 دهندهٔ دو چیز می‌باشد: نیمه عمر کوتاه و یا تجزیه mRNA آن در نتیجه آپوپتوز (۱۵). بیان واریانت‌های ۱۴۰و 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 ۱۴۰و 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 نشان‌دهنده بیان بیشتر سروایوین در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های گرانولوزا است.

واریانت ۴۰ ژن سروایوین در همه گروه ها 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

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

برای تمایز بین سروایوین۱۴۰ و سروایوین۱۲۱ 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 سروایوین۱۲۱ می‌باشد و واریانت‌های دیگر سروایوین 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 سروایوین در طی تکامل فولیکول‌های تخمدانی بود که با یافته‌های کامازاوا و همکاران همخوانی دارد.

نتیجه نهایی :

در این مطالعه بیان نیمه کمی ژن سروایوین 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 بدین‌وسیله 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-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, DeBaere 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

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 vitrifies 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.