

اثر استرادیول ۱۷- بتا بر بیان ژن آنزیم‌های استروژنیک و پروژستازنیک در سلول‌های گرانولوزا گاوی در شرایط برون‌تنی

• عیسی دیرنده (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

• طنناز صابری فر

گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

• حمید دلدار

گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

Email: e.dirandeh@sanru.ac.ir

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر استرادیول ۱۷- بتا بر بیان نسبی ژن‌های گیرنده FSH (FSHR)، گیرنده LH (LHR) و آنزیم‌های استروژنیک و پروژستازنیک (Progestagenic) در سلول‌های گرانولوزای کشت داده شده گاو هلشتاین بود. به طور خلاصه، فولیکول‌های دو تا پنج میلی‌متری از تخمدان گاوهای بالغ از کشتارگاه جمع‌آوری شدند، پس از جدا کردن سلول‌های گرانولوزا در محیط DMEM/F12 به مدت شش روز در در پلیت‌هایی ۲۴ تایی کشت داده شدند و به منظور شمارش تعداد سلول‌ها از رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد استفاده شد. تیمارها شامل (۱) ۵۰۰ هزار سلول گرانولوزا در ml ۵۰۰ محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول گرانولوزا در ml ۲۰۰ محیط کشت، (۳) ۵۰۰ هزار سلول گرانولوزا در ml ۵۰۰ محیط کشت و استرادیول ۱۷- بتا و (۴) ۵۰۰ هزار سلول گرانولوزا در ml ۲۰۰ محیط کشت و استرادیول ۱۷- بتا بودند. برای اندازه‌گیری استرادیول ۱۷- بتا محیط‌های کشت در روز شش جمع‌آوری شدند بر اساس روش رادیوایمونواسی (RIA)، غلظت استرادیول ۱۷- بتا اندازه‌گیری شد. سلول‌ها بوسیله تریزول جمع‌آوری شدند و تا زمان استخراج RNA در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد افزودن استرادیول ۱۷- بتا به محیط کشت سلول‌های گرانولوزای گاو، از یک سو با افزایش بیان ژن آنزیم‌های کلیدی در تبدیل اندروژن به استرادیول ۱۷- بتا (آنزیم‌های استروژنیک) غلظت استرادیول ۱۷- بتا تولید شده به وسیله سلول‌های گرانولوزا را افزایش داد. از سوی دیگر مسیر ساخت پروژسترون را با کاهش بیان ژن آنزیم‌های کلیدی در تبدیل کلاسترول به پروژسترون (آنزیم‌های پروژستازنیک) مهار کرد و در نهایت سبب کاهش لوتئینه شدن و بهبود سلامت فولیکول شد.

کلمات کلیدی: سلول گرانولوزا، استرادیول ۱۷- بتا، کشت سلول، بیان ژن، گاو

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 37-43

Effect of estradiol 17 β on relative gene expression of estrogenic and progestagenic enzymes in cow granulosa cells in vitro

Dirandeh, E., (Corresponding Author), Department of Animal Science, Sari agricultural and Natural Resources University
Saberifar, T., Department of Animal Science, College of Agricultural Science and Natural Resources University of Tehran

Deldar, H., Department of Animal Science, Sari agricultural and Natural Resources University

Email: e.dirandeh@sanru.ac.ir

Received: November 2013 Accepted: December 2013

The objective of this study was to determine the effect of estradiol on mRNA levels encoding FSH receptor (FSHR), LH receptor (LHR), estrogenic and progestagenic enzymes. Briefly, follicles between 2 and 5 mm diameter were dissected from the ovaries of adult cows collected from a local abattoir, cells were collected by rinsing the follicle walls with Dulbecco Modified Eagle medium/F12 (DMEM/F12). A viable cell count was performed in the presence of 0.4 % Trypan Blue and were cultured in 24-well plates for 6 days. Treatments were 1) 500,000 cell/500 ml, 2) 500,000 cell/200 ml, 3) 500,000 cell/500 ml and estradiol 4) 500,000 cell/ 200 ml and estradiol. To measure steroid secretion, the medium was removed for steroid assay on day 6 and measured by RIA. To measure mRNA abundance, cells were collected into Trizol and stored at -80°C until RNA extraction. All data were analyzed by JMP (SAS). Results showed that addition of estradiol to granulosa cell culture medium was stimulated the E2 synthesis in granulosa cells by increasing key enzymes involved in the conversion of androgens to E₂17 β (estrogenic enzyme) and also inhibited the progestin synthetic pathway by decreasing mRNA level of progestagenic enzyme involved in the conversion of cholesterol to P4 and finally decreasing luteinization and improve follicle healthy or oocyte developmental competence.

Key words: Granulosa cell, cell culture, Estradiol, cow.

مقدمه

تحریک فولیکول ها در اثر تراوش گونادوتروپین ها سبب افزایش دو هورمون استروئیدی کلیدی مرتبط با تکامل فولیکول یعنی استرادیول ۱۷- بتا و پروژسترون می شود (۱۱، ۱۳). استرادیول ۱۷- بتا به وسیله سلول گرانولوزا تولید شده و برای رشد سلول گرانولوزا، مهار مرگ سلولی و تنظیم بازخورد مثبت و منفی بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- تخمدان بسیار مهم است. سلول های گرانولوزا و تیکا با همکاری هم، استروژن ها را تولید می کنند (۱۹). سلول های تیکا، آنزیم های ضروری برای تبدیل کلسترول به آندروژن ها را بیان می کنند، اما فاقد آنزیم های ضروری برای تبدیل آندروژن ها به استرادیول هستند. برعکس، سلول های گرانولوزا پروژسترون تولید می کنند اما قادر به تبدیل پرگنی نولون یا پروژسترون به آندروژن ها نیستند. به هر حال، سلول های گرانولوزا می توانند آندروژن ها را به استرادیول ۱۷- بتا تبدیل کنند. پس، آندروژن های تولید شده توسط سلول های تیکا، توسط سلول های گرانولوزا به استرادیول آرومانیزه می شوند (۱۲). در نشخوارکنندگان و انسان تحریک گونادوتروپینی استرادیول ۱۷- بتا نیازمند LH (برای تحریک سلول های تیکا در جهت تولید آندروژن) و FSH (برای تبدیل آندروستندیون به استرادیول ۱۷- بتا) است (۸). آندروستندیون بوسیله آنزیم CYP19 به استرون تبدیل شده و سپس تحت تأثیر 17 β HSD به استرادیول تبدیل می شود. سلول گرانولوزا

همچنین پروژسترون تولید می کند که برای تحریک تخمک ریزی لازم است (۵، ۱۹). تولید پروژسترون نیازمند تبدیل کلسترول به پرگنی نولون است که بوسیله آنزیم CYP11A1 صورت می گیرد و به دنبال آن پرگنی نولون تحت تأثیر آنزیم 3 β HSD به پروژسترون تبدیل می شود (۱۴ و ۱۷). در شرایط درون تنی، بسیاری از ژن های آنزیم های استروژنیک در سلول گرانولوزا فولیکول های آنتروم دار کوچک گاوی (۴ تا ۴ میلی متر) بیان نمی شوند (۱). در سلول گرانولوزا بیان ژن CYP19 و CYP11A1 در طی رشد فولیکولی افزایش می یابد (۲).

استرادیول ۱۷- بتا به عنوان یک میتوژن حائز اهمیت است و تقسیم سلول های گرانولوزا را تحریک می کند. غلیان پیش از تخمک ریزی LH، منجر به لوتئینه شدن سلول های گرانولوزا و تیکا می شود و مسیر استروئیدسازی را تغییر می دهد، یعنی پروژسترون هورمون استروئیدی تولید شده توسط هر یک از این سلول ها، بعد از لوتئینه شدن است (۱۵، ۱۷). تمایز در سلول هایی که قادر به تولید مقادیر زیاد پروژسترون هستند توسط افزایش بیان آنزیم های ضروری برای تبدیل کلسترول به پروژسترون، یعنی C-11A1 و کاهش بیان آنزیم هایی که پروژسترون را به استروژن ها تبدیل می کنند، یعنی 17 β HSD و CYP19، انجام می شود (۱۵). با توجه به موارد گفته شده هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استرادیول در کشت شش روزه سلول های گرانولوزا بر غلظت استرادیول، بیان ژن های FSHR، LHR.

حاوی استرادیول ۱۷-بتا برای چهار روز پیاپی (از روز دوم تا ششم) ng/ml ۱۰ استرادیول به محیط کشت اضافه گردید. کشت فوق با شرایط مشابه در سه هفته متوالی تکرار گردید.

استخراج RNA و Real-Time RT-PCR

استخراج RNA با استفاده از تریزول و بر مبنای دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به منظور رفع آلودگی ناشی از وجود DNA، ابتدا یک واحد DNase به RNA اضافه گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد برای پنج دقیقه انکوبه شد سپس به مدت سه دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. RNA سپس در حضور الیگو dT (۱mmol/L)، آمینوسکریپتاز (۴ واحد، کیازن)، dNTP (۰/۲۵mmol/L)، مهار کننده RNase (۱۹/۳۳ واحد) در حجم ۲۰ μ L در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و سپس برای ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. برای تهیه cDNA از کیت Quantifast Revers-Transcriptase شرکت کیژن استفاده شد. بر اساس پروتکل مربوطه، پس از افزودن محلول gDNA به محلول RNA استخراج شده، نمونه ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. لازم به ذکر است که حجم کل در این مرحله ۱۴ μ L بود. مستر میکس RT که شامل ۱ μ L آنزیم نسخه بردار معکوس، پیش مخلوطی با ۴ μ L بافر QRT و ۱ μ L آغازگر RT بود تهیه شد. به ۶ μ L از مستر میکس حاصل، ۱۴ μ L از محلول RNA اضافه شد. سپس نمونه ها با استفاده از ترموسایکلر (peQLab pri-mus25) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و پس از آن به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. cDNA حاصل پس از اتمام کارها و حل نمودن آن در آب بدون یون و استریل، در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد. آغازگرهای مورد استفاده برای اطمینان از تکثیر با استفاده از یک cDNA و Real-time PCR (Applied Biosystems, ABI Prism7300) شدند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت QuantiFast SYBR Green PCR شرکت کیژن) واکنش های Real Time PCR انجام شدند. پس از تایید توالی و صحت طول قطعه تولیدی با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI، آغازگرهای مورد نظر ساخته شدند (جدول ۱). برای استفاده بهینه از کیت، واکنش ها برای حجم ۲۵ μ L تنظیم شدند (مسترمیکس سایبرگرین ۱۲/۵ μ L؛ جفت آغازگر اختصاصی ۱+۱ μ L؛ cDNA، آب دوبار تقطیر شده ۹/۵ μ L).

آنزیم های استروژنیک (CYP19، 17 β HSD) و آنزیم های پروژستازنیک (CYP11A1 و StAR) بود.

مواد و روش ها

کشت سلول

تخمندان گاوهای بالغ از کشتارگاه جمع آوری گردید و در محلول PBS، پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ μ g/ml) و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد. سپس سلول های گرانولوزا بر اساس روش Gutierrez و همکاران (۹) و بر مبنای انتخاب فولیکول هایی با فنوتیپ استروژنی با حداقل لوتئینه شدن کشت داده شدند (۱۵). کلیه مواد به جز آن هایی که در متن اشاره شده است از شرکت اینویترژن (برلینگتون، انتاریو، کانادا) خریداری شدند. به طور خلاصه برای کشت سلول ها، فولیکول های ۲-۵ میلی متری گاوهای بالغ زیر هود قطعه قطعه شده و سپس در محیط کشت DMEM/F۱۲ (Medium Nutrient Mixture F-۱۲ Dulbecco Modifeid Eagle)، سلول ها جدا و فیلتر گردید. محیط کشت پایه برای سلول ها DMEM/F۱۲ بوده که به آن بی کربنات سدیم (۱۰۰ Mm)، سلنیت سدیم (۴ng/ml)، آلبومین سرم گاوی (۱۰٪)، پنی سیلین (۱۰۰ U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ μ g/ml)، ترانسفرین (۲/۵ μ g/ml)، ترکیب اسیدهای آمینه غیر ضروری (۱/۱ mM)، فانگیزون (۱ mg/ml) و اندروستندایون (۷-۱۰ M) اضافه گردید. پس از سه مرحله سانتریفیوژ و دور ریختن سطح بالایی، به رسوب پایین لوله که حاوی سلول ها بود ۱۰ ml محیط کشت DMEM/F۱۲ پایه اضافه گردید (۴) و سپس با استفاده از تریپان بلو ۰/۴ درصد تعداد سلول ها شمارش شدند و در پلت ۲۴ تایی (۶×۴) در چهار تیمار قرار گرفتند. تیمارها شامل (۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و افزودن استرادیول ۱۷-بتا از روز دوم کشت و (۴) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت و افزودن استرادیول از روز دوم کشت. پلیت ها درون انکوباتور، با پنج درصد دی اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با بیشینه رطوبت نسبی (۹۸ درصد) برای شش روز کشت داده شدند و هر یک روز در میان ۷۰۰ μ L از محیط کشت با محیط کشت جدید جایگزین گردید. در روزهای صفر، دوم و چهارم به تمامی تیمارها انسولین گاوی اضافه شد. علاوه بر آن جهت رشد سلول ها، در روزهای دوم و چهارم هورمون FSH گاوی (۱ ng/ml) به محیط کشت اضافه شد. در تیمارهای

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در واکنش های Real Time PCR

| ژن | Reverse (۵-۳) | Forward (۵-۳) |
|----------------|----------------------------|----------------------------|
| H2AFZ | TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC | GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG |
| 17 β HSD | CAGCGTGGCATACTTTGAA | TGTGGTACTCATTACCGGCTGTT |
| CYP19 | GAAAAATAGAAAAATCCCCA | AAAAAATGTATTTGGCTTCG |
| FSHR | GTTCTCACCGTGAGGTAGATGT | AGCCCCTTGTCAACTCTATGTC |
| StAR | TGC GAG AGG ACC TGG TTG AT | CCC AGC AGA AGG GTG TCA TC |
| CYP11A1 | GTAGGATCCCTCGAACTTGAAGA | ACAGGGAGAAGCTTGGCAATT |
| LHR | TTGGGTAAGCAGAAACCATAGTCA | GCACAGCAAGGAGACCAAATAA |

تجزیه و تحلیل آماری

برای نرمال کردن داده‌های حاصل از بیان ژن از لگاریتم‌گیری استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار JMP آنالیز واریانس انجام گردید، به طوری که اثر حیوان به‌عنوان اثر ثابت و تکرار کشت (هر هفته) به‌عنوان اثر تصادفی در تست F در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گردید.

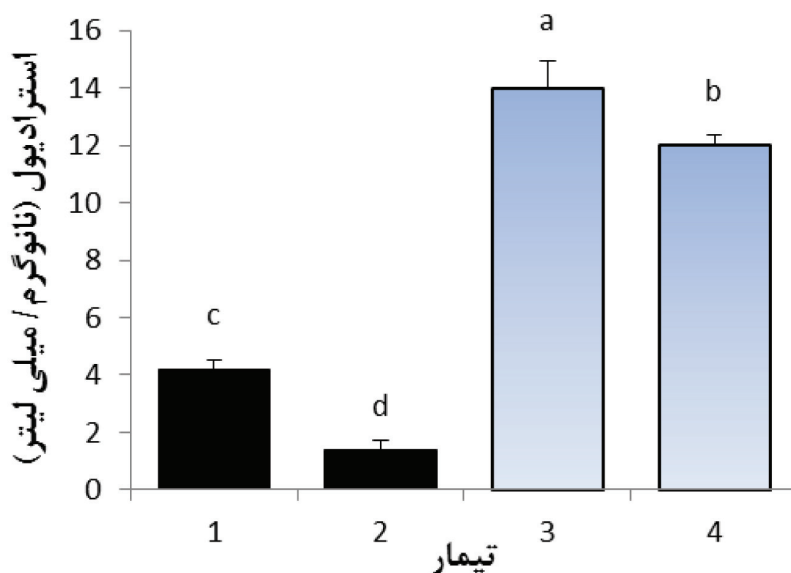
نتایج

همانطور که در نگاره یک مشاهده می‌شود افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا باعث کاهش تراوش استرادیول در محیط کشت شد. نتایج نشان داد در شرایطی که تعداد سلول‌ها ثابت باشد کاهش محیط کشت (افزایش تراکم) سبب کاهش غلظت استرادیول می‌گردد. افزودن استرادیول نیز سبب افزایش غلظت استرادیول شد. کاهش تراوش استرادیول که با افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا همراه بود با کاهش بیان نسبی FSHR، CYP19، 17βHSD و افزایش بیان نسبی LHR و بیان نسبی آنزیم‌های CYP11A1 و StAR در ارتباط بود. از سوی دیگر، افزودن استرادیول سبب افزایش بیان نسبی FSHR، و بیان نسبی آنزیم‌های CYP19، 17βHSD و همچنین سبب کاهش بیان نسبی LHR و بیان نسبی آنزیم‌های CYP11A1 و StAR شد.

برای به‌دست آوردن بهترین چرخه حرارتی، نخست از PCR معمولی استفاده شد و پس از تنظیم کردن شرایط از Real-Time PCR استفاده شد. در انتهای PCR، عمل گسستن رشته‌های DNA و ایجاد منحنی ذوب به‌وسیله حرارت دادن آهسته نمونه‌ها از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ثبت مستمر کاهش در فلورسنس در نتیجه افتراق دو رشته DNA انجام شد. چرخه آستانه (CT) که در آن افزایش فلورسنس ثبت شده در حد بیشتر از خط پایه برای اولین بار قابل تشخیص می‌شود، برای هر یک از نمونه‌ها تعیین شد. سطوح mRNA ژن‌ها بر اساس بازدهی PCR و انحراف CT یک نمونه ناشناخته نسبت به کنترل با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برآورد شد. mRNA ی H2AFZ به‌عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت (راهنمای شرکت ABI، لیواک، ۲۰۰۳). کلیه نمونه‌ها با سه تکرار استفاده شدند.

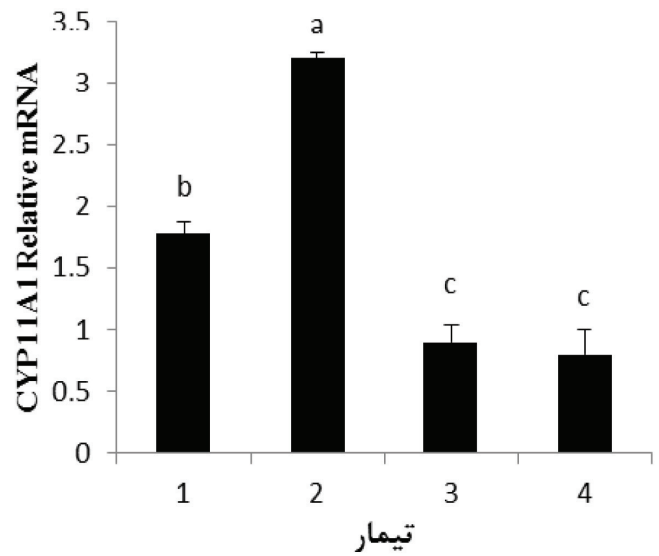
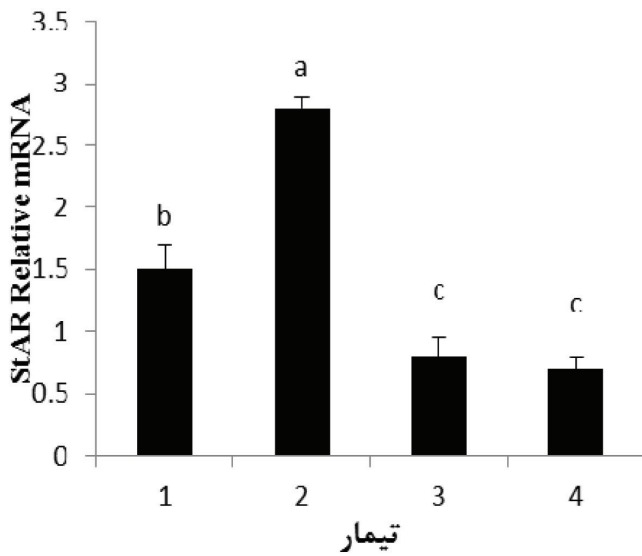
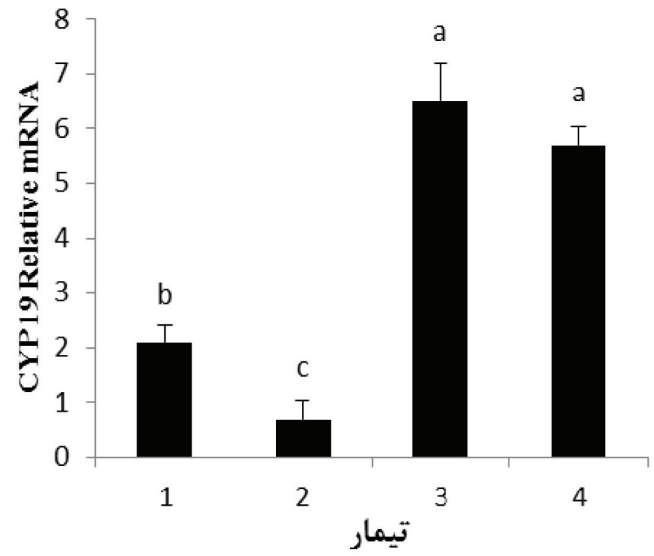
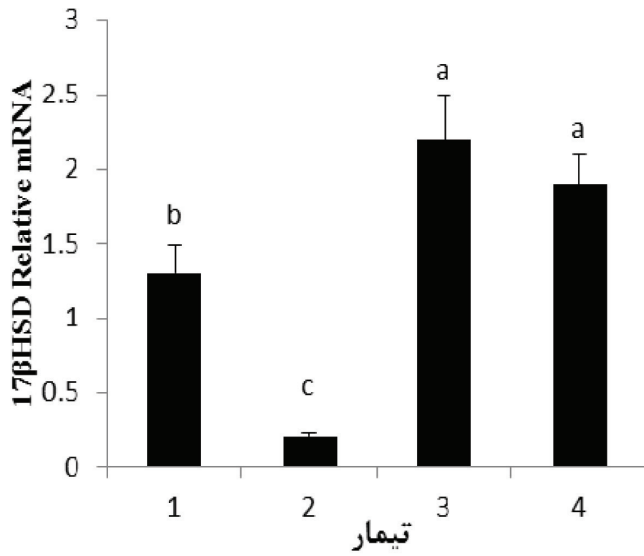
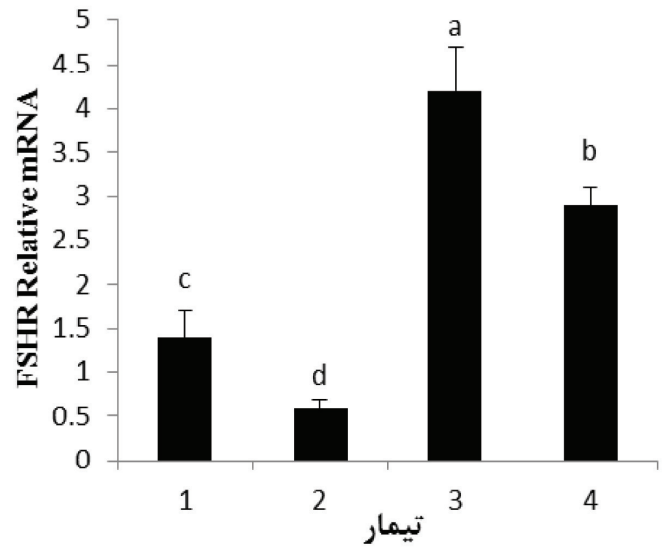
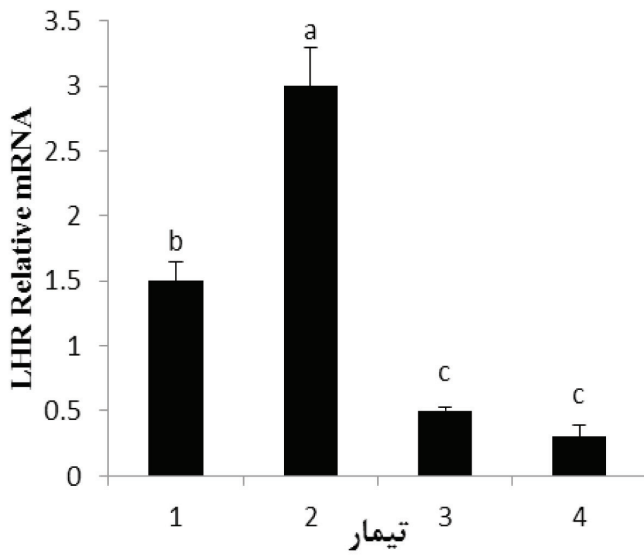
اندازه‌گیری استرادیول

جهت اندازه‌گیری غلظت استرادیول در روزهای چهارم تا ششم؛ ۷۰ درصد محیط کشت جمع‌آوری، و با محیط کشت جدید جایگزین گردید، و در روز ششم کل محیط کشت جمع‌آوری گردید. غلظت استرادیول در نمونه‌ها بر اساس روش RIA (۴) و با دو تکرار برای هر نمونه انجام گرفت. حساسیت استرادیول ۱۰ pg/mL بود.



نمودار ۱- غلظت استرادیول ۱۷-بتا

(۱) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت، (۲) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت، (۳) ۵۰۰ هزار سلول در ۵۰۰ mL محیط کشت و استرادیول ۱۷-بتا (۴) ۵۰۰ هزار سلول در ۲۰۰ mL محیط کشت و استرادیول ۱۷-بتا. (a, b, c, d) میانگین‌هایی که حرف مشترک انگلیسی ندارند، دارای اختلاف معنی دارند ($P < 0.05$).



بحث

تنظیم تولید استرادیول ۱۷- بتا و پروژسترون در سلول گرانولوزا برای رشد فولیکول بسیار ضروری است. ساخت استرادیول ۱۷- بتا از آندروژن‌ها نیازمند آروماتیزاسیون آندروژن‌ها به وسیله آنزیم CYP19 است. استفاده از FSH سبب افزایش تراوش استرادیول و بیان ژن CYP19 و 17βHSD می‌شود (۱۵، ۲۰). همانطور که انتظار می‌رفت در مطالعه حاضر نیز استفاده از استرادیول ۱۷- بتا سبب افزایش بیان نسبی ژن CYP19 و به دنبال آن افزایش غلظت استرادیول ۱۷- بتا گردید. آنزیم 17βHSD که برای تبدیل آندروژن به استرادیول ۱۷- بتا ضروری است در مطالعه حاضر تحت تاثیر تیمار استرادیول ۱۷- بتا افزایش یافت و اثرات مهارکنندگی افزایش تراکم سلول را از بین برد.

در شرایط درون تنی، فراوانی mRNA CYP19 بین روزهای دوم و چهارم بعد از پدیدار شدن موج فولیکولی افزایش نشان می‌دهد ولی در بین روزهای چهارم تا ششم افزایش بیشتری نشان داده و در همان سطح باقی می‌ماند (۱۸). Bao و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند بیان CYP19 در فولیکول‌های با اندازه متوسط در طی پدیدار شدن موج فولیکولی با افزایش موقت در غلظت FSH پلازما افزایش می‌یابد و مقدم بر شروع موج فولیکولی است (۲). غلظت‌های فیزیولوژیک FSH سبب بیشینه تحریک سطح بیان CYP19 شده در حالی که غلظت‌های فارماکولوژیک FSH سبب از بین رفتن این پاسخ می‌شود (۱۶). در این پژوهش، کاهش تراوش استرادیول ۱۷- بتا که ناشی از افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا بود با کاهش بیان نسبی گیرنده FSH همراه بود که این امر می‌تواند کاهش بیان نسبی ژن‌های CYP19 و 17βHSD را توجیح نماید. زیرا هر دو آن‌ها وابسته به FSH هستند (۱۵ و ۱۶). از سوی دیگر، افزودن استرادیول ۱۷- بتا به محیط کشت سلول‌های گرانولوزا سبب افزایش بیان نسبی گیرنده FSH شد که همین امر می‌تواند دلیلی بر افزایش سطوح mRNA کدکننده CYP19 و 17βHSD باشد.

Fitzpatrick و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند تراوش استرادیول ۱۷- بتا و بیان CYP19 به میزان قابل توجهی در سطوح بالای LH کاهش پیدا کردند در حالیکه در اثر افزودن FSH افزایش یافتند (۶). FSH به‌طور طبیعی سبب افزایش اندک در cAMP داخل سلولی گشته و در نتیجه سبب افزایش بیان CYP19 می‌شود در حالی که LH سبب افزایش بیشتر cAMP شده که در نهایت منجر به لوتئینه شدن و کاهش بیان CYP19 می‌شود. غلظت‌های بیشتر LH سبب فعال شدن مسیر پیامبر ثانویه پروتئین کیناز C شده که در نهایت کاهش بیان CYP19 را به دنبال خواهد داشت (۷).

در مطالعه حاضر افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا در واحد حجم محیط کشت به همراه افزایش بیان نسبی CYP19 و LHR، سبب شروع لوتئینه شدن و در نهایت افزایش وقوع اترزی در سلول‌های گرانولوزا شد و میزان استرادیول ۱۷- بتا تولیدی را کاهش داد. در حالیکه افزودن استرادیول ۱۷- بتا بیان نسبی ژن‌های CYP19 و LHR را کاهش داد که می‌تواند از رفتن سلول به سمت اترزی جلوگیری کند و با کاهش لوتئینه شدن کیفیت اووسایت را افزایش دهد. در فولیکول‌های اترال در حال تکامل باید نسبت استرادیول ۱۷- بتا به پروژسترون بیشتر باشد و ضروری است سطح پروژسترون تا زمان تخم‌ریزی پایین باشد زیرا

افزایش پروژسترون قبل از بلوغ با اترزی فولیکول در ارتباط است (۱۰ و ۱۲). Zheng و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند استفاده از دوزهای پایین FSH فقط سبب افزایش استرادیول ۱۷- بتا گردید و تأثیری بر غلظت پروژسترون نداشت (۲۰).

به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد با افزایش تراکم سلول‌های گرانولوزا، بیان نسبی StAR و CYP19 افزایش یافت و با افزودن استرادیول ۱۷- بتا بیان آن کاهش یافت که سیگنالی مثبت برای کاهش تولید پروژسترون و در نهایت کاهش اترزی است که با توجه به افزایش بیان نسبی FSHR در اثر افزون استرادیول ۱۷- بتا این نتیجه قابل توجیح است. لذا با توجه به کاهش بیان دو ژن کلیدی در مسیر ساخت پروژسترون می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استرادیول ۱۷- بتا اثر مهاری بر مسیر ساخت پروژسترون‌ها داشته و در نهایت تولید پروژسترون را می‌تواند کاهش دهد (۱۷). Zheng و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که FSH بیان ژن StAR را در شرایط برون تنی به‌صورت منفی کاهش (Down regulate) می‌دهد (۲۰). به همین دلیل است که در فولیکول سالم دارای اترال در هر اندازه‌ای در شرایط درون تنی StAR قابل شناسایی نیست (۳، ۱۲). Sahmi و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند تحت تاثیر FSH بیان ژن‌های StAR و CYP19 به همراه غلظت پروژسترون، افزایش یافت (۱۵). Zheng و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که TGFβ سبب کاهش فراوانی بیان ژن‌های CYP19، StAR و 3βHSD گردید و به دنبال آن تراوش پروژسترون را کاهش داد (۲۰).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از استرادیول ۱۷- بتا با افزایش بیان ژن آنزیم‌های کلیدی دخیل در تبدیل آندروژن به استرادیول ۱۷- بتا (آنزیم‌های استروژنیک) سبب افزایش غلظت استرادیول ۱۷- بتا گشته و با کاهش بیان ژن آنزیم‌های کلیدی دخیل در تبدیل کلسترول به پروژسترون (آنزیم‌های پروژستروژنیک) سبب مهار مسیر ساخت پروژسترون می‌شود و در نتیجه میزان لوتئینه شدن را کاهش داد.

منابع مورد استفاده

- 1- Bao, B. and Garverick, H.A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*. 76. pp: 1903-1921.
- 2- Bao, B. Garverick, H.A. Smith, G.W. Smith, M.F. Salfen, B.E. and Youngquist, R.S. (1997). Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 56. pp: 1158-1168.
- 3- Bao, B. Calder, M.D. Xie, S. Smith, M.F. Salfen, B.E. Youngquist, R.S. and Garverick, H.A. (1998). Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection,

- and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biology of Reproduction*. 59. pp: 953–959.
- 4- Belanger, A. Couture, J. Caron, S. and Roy, R. (1990). Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Ann N Y Acad Sci*. 595. pp: 251–9.
- 5- Drummond, A.E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4. pp:16-23.
- 6- Fitzpatrick, S.L. and Richards, J.S. (1991). Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 129. pp:1452–1462.
- 7- Fitzpatrick, S.L. Carlone, D.L. Robker, R.L. and Richards, J.S. (1997). Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids*. 62. pp: 197–206.
- 8- Fortune, J.E. (1986). Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biology of Reproduction*. 35. pp: 292–299.
- 9- Gutierrez, C.G. Campbell, B.K. and Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*. 56. pp: 608–16.
- 10- Irving-Rodgers, H.F. Krupa, M. Rodgers, R.J. (2003). Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and the concentrations of steroid hormones in the follicular fluids of different phenotypes of healthy and atretic bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 69. pp: 2022–2028.
- 11- Kolibianakis, E.M. Papanikolaou, E.G. Fatemi, H.M. Devroye, P. (2005). Estrogen and folliculogenesis: is one necessary for the other? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 17. pp: 249–253.
- 12- Mihm, M. Baker, P.J. Fleming, L.M. Monteiro, A.M. O'Shaughnessy, P.J. (2008). Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. *Reproduction*. 135. pp: 253–65.
- 13- Price, C.A. Carriere, P.D. Gosselin, N. Kohram, H. and Guibault, L.A. (1999). Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theoriology*. 51. pp: 37–46.
- 14- Raffalli-Mathieu, F. Persson, D. and Mannervik, B. (2007). Differences between bovine and human steroid double-bond isomerase activities of Alpha class glutathione transferases selectively expressed in steroidogenic tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770. pp: 130–136.
- 15- Sahmi, M. Nicola, E.S. Silva, J.M. and Price, C.A. (2004). Expression of 17b- and 3b-hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 223. pp: 43–54.
- 16- Soumano, K. and Price, C.A. (1997). Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biology of Reproduction*. 56. pp: 516–522.
- 17- Velerio, P.M. Gustavo, Z. Price, C.A. (2010). Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 93. 6. pp: 2050-2055.
- 18- Xu, Z. Garverick, H.A. Smith, G.W. Smith, M.F. Hamilton, S.A. and Youngquist, R.S. (1995). Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*. 136. pp: 981–989.
- 19- Xuesong, Wen. Dong, Li. Tozer, A.J. Suzanne, M. Docherty, R. Iles, K. (2010). Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:117.
- 20- Zheng, X. Price, C.A. Tremblay, Y. Lussier, J.G. and Carriere, P.D. (2008). Role of transforming growth factor-b1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells. *Reproduction*. 136. pp: 447–57.

