

اثر چرخه تخمدانی بر بیان گیرنده‌های زنگوله‌ای شکل *TLR4* در آمپولا و ایستموس اویداکت گاوهای شیری هلستاین

رسول کوثر^{۱*}، مرتضی زهرازاده^۲ و علی صادقی سفیدمزگی^۱

۱ و ۲. استادیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۹)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، بررسی الگوی بیان ژن *TLR4* در آمپولا و ایستموس اویداکت گاو در مراحل مختلف چرخه تخمدانی (پیش از تخمک‌ریزی، پس از تخمک‌ریزی و میانه چرخه) بود. مرحله چرخه تخمدانی با توجه به ظاهر، اندازه و رنگ جسم زرد و فولیکول چیره مشخص شد. بیان ژن *TLR4* در ایستموس و آمپولای ۴۰ اویداکت به روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، که در اویداکت‌های واقع در سمت تخمدان فعال (دارای فولیکول غالب یا جسم زرد)، میزان بیان ژن *TLR4* در ایستموس به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از آمپولا بود. همچنین، پیش از تخمک‌ریزی، بیان ژن *TLR4* در آمپولا و ایستموس اویداکت‌های واقع در سمت تخمدان فعال به‌صورت معنی‌داری از دیگر مراحل چرخه تخمدانی و همچنین از آمپولا و ایستموس اویداکت‌های مربوط به تخمدان غیرفعال (فاقد فولیکول غالب یا جسم زرد) بیشتر بود. به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن *TLR4* در اویداکت گاو تحت تأثیر وضعیت هورمونی (چرخه تخمدانی)، موقعیت قرارگیری آن نسبت به تخمدان فعال و ناحیه اویداکتی (آمپولا یا ایستموس) قرار دارد.

واژه‌های کلیدی: اویداکت، ایمنی ذاتی، چرخه فحلی، گاو شیری، *TLR4*.

Effect of ovarian cycle on *TLR4* mRNA expression pattern in ampulla and isthmus of the bovine oviduct

Rasoul Kowsar^{1*}, Morteza Zahrazadeh² and Ali Sadeghi Sefidmazgi³

1, 2. Assistant Professor and Ph. D. Candidate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, PO BOX: 84156/83111, Isfahan, Iran
(Received: May 6, 2018 - Accepted: Jul. 31, 2018)

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the *TLR4* gene expression's pattern in ampulla and isthmus of dairy cows during the ovarian cycle. The ovarian cycle phase was determined based on the appearance, size, and color of corpus luteum and dominant follicle. The *TLR4* expression was assessed in ampulla and isthmus of 40 oviducts using qRT-PCR. Results showed that the pre-ovulatory phase, *TLR4* gene expression in the isthmus of ipsilateral oviducts was significantly greater than that in ampulla. Also, the expression of *TLR4* in ampulla and isthmus of the oviducts ipsilateral to the pre-ovulatory ovary was significantly greater than that in the ampulla and isthmus of oviducts contralateral to the post-ovulatory or mid-cycle ovaries. In general, the present study showed that, *TLR4* mRNA expression was differentially influenced by the stage of the ovarian cycle, its relation to the functional ovary, and the oviductal parts (ampulla or isthmus) in bovine.

Keywords: Dairy cow, estrous cycle, innate immunity, oviduct, *TLR4*.

مقدمه

اویداکت پستانداران، محیطی مناسب را برای فعال‌سازی و انتقال گامت‌ها، ظرفیت‌پذیری اسپرم، لقاح و رشد آغازین رویان آماده می‌سازد؛ که برای موفقیت آبستنی ضروری است (Kölle et al., 2010). بنابراین، حفظ شرایط پایدار اویداکت و عملکرد دقیق و کنترل شده سیستم ایمنی در این بخش می‌تواند تأثیر بسزایی بر موفقیت آبستنی داشته باشد (Coy et al., 2012). سلول‌های اپیتلیال (پوششی) به صورت مستقیم به تحریک‌های میکروبی (بیماری‌زا) و غیرمیکروبی (تنش و هورمون‌ها) پاسخ داده و باعث بروز پاسخ‌های ایمنی می‌شوند (Schleimer et al., 2007). گزارش شده است که سلول‌های پوششی اویداکت از طریق ترشح مولکول‌های خاصی، مثل پروستاگلاندین‌ها، کیموکین‌ها و سیتوکین‌ها، موجب بروز پاسخ‌های ایمنی به صورت موضعی می‌شوند (Bulek et al., 2010; Swamy et al., 2010). سیستم ایمنی ذاتی، با استفاده از گیرنده‌های زنگوله‌ای شکل (Toll-like receptors (TLRs)) می‌تواند الگوهای مولکولی مرتبط با عوامل بیماری‌زا یا پاتوژن‌ها (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) را تشخیص دهد (Kumar et al., 2009). گیرنده‌های زنگوله‌ای شکل با اتصال به سموم تولیدی توسط میکروب‌ها، آن‌ها را شناسایی کرده و از این طریق باعث القای التهاب می‌شوند (Netea et al., 2004). تاکنون تعداد ۱۰ نوع TLR شناسایی شده است (Hornung et al., 2002)؛ که از این میان، *TLR4* عمدتاً به لیپوپلی‌ساکارید (LPS) تولید شده از باکتری‌های گرم منفی مثل ای-کولای (*E-Coli*) پاسخ می‌دهد (Lu et al., 2008). لیپوپلی‌ساکارید موجود در غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی، می‌تواند سبب القای التهاب شود (Lu et al., 2008). همچنین، برخی مولکول‌های درون‌زا (اندوژنوس) مثل پروتئین‌های شوک حرارتی، هیالورونیک اسید و بتا-دفنسین ۲ می‌توانند *TLR4* را نیز تحت تأثیر قرار داده و فعال کنند (Ohashi et al., 2000; Biragyn et al., 2002). به طور مثال، گزارش شده است که این دسته از گیرنده‌ها (TLR) در فرآیند ظرفیت‌پذیری اسپرم در

دستگاه تولیدمثل حیوان ماده نقش ایفا می‌کنند (Shimada et al., 2008). به طوری که فعال‌سازی *TLR2* و *TLR4* توسط ترکیبات هیالورونانی تولیدشده در اثر فعالیت آنزیم هیالورونیداز اسپرم سبب تولید کیموکین‌ها و سیتوکین‌های خاصی از سلول‌های کومولوس اطراف تخمک (مجموعه تخمک-سلول‌های کومولوس) می‌شود. این سیتوکین‌ها سبب القای ظرفیت‌پذیری اسپرم و بهبود باروری می‌شوند (Shimada et al., 2008). فعال شدن فاکتور هسته‌ای کاپای بی (NF-kB)، در اثر فعال شدن *TLR4*، به بیان عوامل التهاب‌زا از قبیل سیتوکین‌ها و کیموکین‌ها منتهی می‌شود (O'Neill, 2006). سطوح بالای عوامل التهاب‌زا مثل TNF- α و IL-1 β می‌تواند اثرات مخربی بر اویداکت (Ault et al., 1996; Hvid et al., 2007) و در پی آن بر لقاح و سلامت رویان داشته باشد (Ibrahim et al., 2015; Robertson et al., 2018).

در مطالعه Kowsar et al. (2013) نشان داده شد که اویداکت گاو و به طور ویژه سلول‌های پوششی آن، *TLR4* را هم در سطح ژن و هم در سطح پروتئین بیان می‌کند و سطح بیان آن در شرایط آزمایشگاهی، برون تنی (in vitro)، تحت تأثیر LPS افزایش می‌یابد؛ در حالی که هورمون‌های LH، پروژسترون و استرادیول به طور معنی‌داری این افزایش بیان *TLR4* (در اثر تحریک سلول‌ها با LPS) را خنثی می‌کنند.

براساس مطالعات انجام‌شده، گیرنده هورمون‌های LH، E2 و پروژسترون در اویداکت گاو بیان می‌شوند (Kowsar et al., 2013) و بیان آن‌ها اثرات متفاوتی بر اویداکت و حتی بر پاسخ‌های ایمنی آن دارد (Verthelyi, 2001; Zandieh et al., 2016). به طور مثال، پروژسترون سبب مهار افزایش بیان ژن‌های عوامل التهاب‌زا مثل *TLR4* و *IL-1 β* در سلول‌های پوششی اویداکت تحریک شده با LPS شد (Kowsar et al., 2013).

بنابراین، در مطالعه حاضر بیان ژن *TLR4* در آمپولا و ایستموس اویداکت گاو در زمان‌های مختلف چرخه فحلی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، در این مطالعه، با انجام تحلیل‌های ری‌اکتومی، مسیرهای سلولی فعال شده در اثر بیان ژن *TLR4* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در دانشگاه کشاورزی و دامپزشکی ابیهیرو ژاپن، هوکایدو، و بر اساس قوانین آسایش و استفاده از حیوانات و دستورالعمل دانشگاه انجام شد.

جمع‌آوری اوبداکت‌ها و تعیین وضعیت چرخه تخمدانی

در کشتارگاه، ابتدا دستگاه تناسلی گاوها از این لحاظ که عاری از عفونت، التهاب و تغییر رنگ باشند، مورد بررسی قرار گرفتند و اوبداکت و تخمدان‌های سالم جمع‌آوری شدند. تعداد ۴۰ نمونه اوبداکت و تخمدان از ۲۰ رأس گاو هلشتاین جمع‌آوری شد و در یک ظرف حاوی محلول نمکی بافر فسفات (PBS) فاقد کلسیم و منیزیم حاوی ۰/۳ درصد جنتامایسن (سیگما) و آمفوتریسین B و روی یخ از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، تخمدان‌ها (از لحاظ این که دارای کیست و عفونت نباشند) و اوبداکت‌ها (دچار التهاب، آسبه و عفونت نباشند)، بازبینی شدند. مرحله چرخه تخمدانی بر اساس ظاهر، وزن و رنگ جسم زرد و قطر فولیکولی مشخص شد (Ireland *et al.*, 1980; Kowsar *et al.*, 2014). به طور کلی، مرحله پیش از تخم‌ریزی با وجود تخمدان‌هایی که دست‌کم دارای یک فولیکول بزرگ (>۱۰ میلی‌متر) و یک جسم زرد تحلیل رفته (>۱۰ میلی‌متر، دارای یک بافت سفت، بدون شبکه رگی قابل مشاهده و دارای ظاهری سفید رنگ) بودند، در نظر گرفته شد (۱ تا ۲ روز پیش از تخم‌ریزی). مرحله پس از تخم‌ریزی با دیدن محل تخم‌ریزی و یا با یک جسم زرد با اندازه ۵ تا ۱۵ میلی‌متر که با بافت پوششی پوشیده نشده است، تعیین شد. در این زمان، جسم زرد، رنگی قرمز و بافتی شل دارد و فولیکولی بزرگ‌تر از ۸ میلی‌متر روی تخمدان وجود ندارد (۱ تا ۲ روز پس از تخم‌ریزی). مرحله میانی چرخه نیز با حضور یک جسم زرد بالغ با اندازه ۱۵ تا ۲۵ میلی‌متر با یک رنگ نارنجی شناخته شد (روز ۱۲ تا ۱۶ پس از تخم‌ریزی) (Ireland *et al.*, 1980; Kowsar *et al.*, 2014).

اوبداکت‌ها براساس قرارگیری نسبت به (۱) تخمدان فعال دارای فولیکول غالب (ایپسی لیترال، ۷ عدد)، (۲) تخمدان غیر فعال (بدون فولیکول غالب یا جسم زرد، کنترا لیترال، ۷ عدد)، (۳) تخمدان تخم‌ریزی کرده

(ایپسی لیترال، ۷ عدد)، (۴) تخمدان بدون تخم‌ریزی (کنترا لیترال، ۷ عدد)، (۵) تخمدان دارای جسم زرد بالغ (ایپسی لیترال، ۷ عدد) و (۶) تخمدان فاقد جسم زرد بالغ (کنترا لیترال، ۷ عدد) تقسیم بندی شدند. در ادامه، بافت پیوندی از اوبداکت‌ها جداسازی شد و به طور جداگانه از بخش‌های مختلف اوبداکت (آمپولا و ایستموس) نمونه‌گیری انجام گرفت. سپس، نمونه‌ها با محلول تریزول (Invitrogen) ترکیب و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند. پیش از استخراج RNA، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه همگن‌ساز فراصوتی (Hielscher Ultrasonics GmbH, UP400S, Teltow، آلمان) آماده‌سازی شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

کل RNA با استفاده از پروتکل TRIzol (Roche، آمریکا) استخراج شد (Chomczynski & Sacchi, 1987). غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (اپندورف، مونخ، آلمان) در جذب نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. RNA استخراج‌شده در محلول ذخیره RNA (Ambion، آمریکا) و دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس تا زمان استفاده برای سنتز cDNA نگهداری شد. برای حذف DNA، از کیت DNase (Promega، آمریکا) استفاده شد (Watanabe *et al.*, 2006). cDNA سنتز شده در دمای منفی ۳۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد. در این مطالعه ژن *TLR4* مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری بیان mRNA با استفاده از cDNA سنتز شده از طریق PCR در زمان حقیقی (Roche Diagnostics) با استفاده از یک توالی‌یاب (QuantiTect™ SYBR Green، QIAGEN، آلمان) انجام شد. پرایمر مورد نظر با استفاده از پرایمر ۳ بر اساس توالی‌های گاو طراحی شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) شامل ۱۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C و در ادامه ۴۰ چرخه PCR (۱۵ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۶°C و ۲۰ ثانیه گسترش در دمای ۷۲°C) بود. در این آزمایش بیان ژن *TLR4* بر اساس بیان ژن بتا-اکتین استانداردسازی شد (Kowsar *et al.*, 2013).

جدول ۱. آغازگرهای (پرایمر) استفاده شده در Real time PCR

Table 1. The TLR-4 primer in real-time PCR

Accession number	Length of PCR (product)	Annealing temperature	Primer sequence	GENE
NM_174198.6	153	56	F: CTTGCGTACAGGTTGTTCTAA R: CTGGGAAGCTGGAGAAGTTATG	TLR-4
K00622	256	85	F: CCAAGGCCAACCCTGAGAAAAT R: CCACATTCCTGAGGATCTTCA	β -actin

R (Reverse): معکوس، F (Forward): رو به جلو

آنالیز ری‌اکتومی داده‌ها

از ابزار آنالیز مسیرهای زیستی ری‌اکتوم به منظور بررسی داده‌های حاصل از بیان ژن استفاده شد (Jupe *et al.*, 2015). این ابزار، بدون نیاز به نصب بر روی رایانه قابلیت اجرا به صورت آنلاین (<https://reactome.org>) را دارد. ابتدا، داده‌های حاصل از بیان ژن *TLR4* را به بخش "آنالیز داده" برنامه وارد کرده و سپس داده‌ها بر اساس مسیرهای آرتاساخت (اورتولوگ) بین انسان و گاو آنالیز شدند (Fabregat *et al.*, 2017). در پایان، نرم‌افزار ری‌اکتوم مسیرهای تحت تأثیر قرار گرفته را به صورت یک پرونده قابل بارگیری (CSV). در دسترس قرار می‌دهد. مسیرهایی که بیش از حد تحت تأثیر قرار گرفته‌اند، دارای $P < 0.05$ هستند.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (SAS 9.1, 2003; Institute Inc., Cary, NC, USA) تجزیه و تحلیل شدند. نرمال‌سازی باقیمانده‌ها با استفاده از تبدیل لگاریتمی (در مبنای ۲) انجام شد. مدل آماری استفاده شده در این آزمایش برای تعیین بیان ژن *TLR4* در مراحل مختلف چرخه تخمدانی عبارت بود از:

$$Y_i = \mu + P_i + e_i$$

که Y_i متغیر مستقل، μ میانگین جامعه، P_i مرحله چرخه تخمدانی و e_i عوامل باقیمانده بود (post hoc) Fisher's multiple comparison test برای مقایسه سه گروه (Kowsar *et al.*, 2014). همچنین، مدل آماری مورد استفاده برای ارزیابی بیان ژن *TLR4* در بخش‌های متفاوت اویداکت (آمپولا و ایستموس) به صورت زیر بود:

$$Y_i = \mu + S_i + e_i$$

Y_i متغیر مستقل، μ میانگین جامعه، S_i ناحیه اویداکتی (آمپولا یا ایستموس) و e_i اثر عوامل باقیمانده

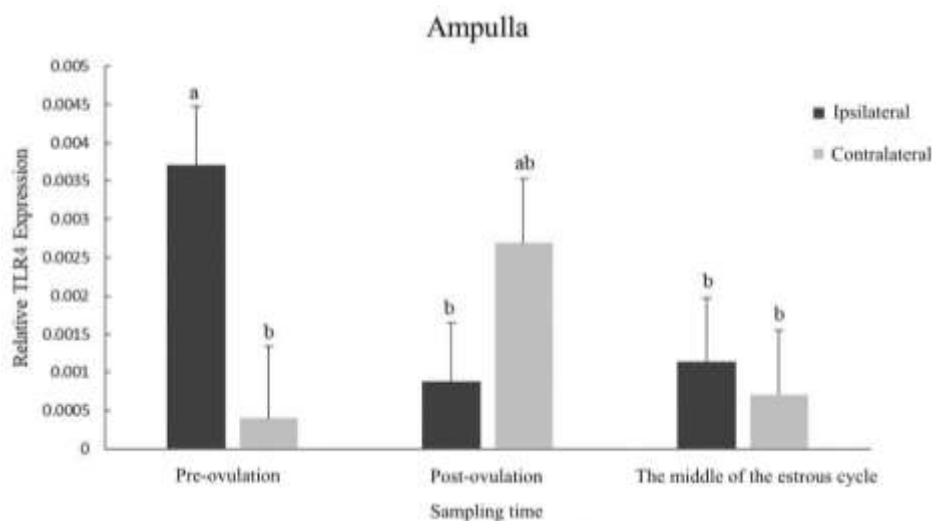
بود. برای مقایسه میانگین‌ها (مقایسه دو گروه) از آزمون تی- استیودنت (Kowsar *et al.*, 2014). بر مبنای کم‌ترین اختلاف معنی‌دار (LSD) استفاده شد. سطح معنی‌داری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مربوط به بیان ژن *TLR4* در آمپولای گاو، طی مراحل مختلف چرخه تخمدانی، در شکل ۱ نشان داده شده است. بیان ژن *TLR4* در آمپولای اویداکت در سمت تخمدان فعال (دارای فولیکول آماده تخم‌ریزی (ipsilateral)) پیش از تخم‌ریزی در بیشترین مقدار خود بود ($P < 0.05$) اما پس از تخم‌ریزی کاهش یافت ($P < 0.05$). بیان ژن *TLR4* در آمپولای اویداکت قرار گرفته در سمت تخمدان غیر فعال (contralateral) تحت تأثیر مراحل مختلف چرخه تخمدانی قرار نگرفت.

شکل ۲، نتایج مربوط به بیان ژن *TLR4* را در ایستموس گاو طی مراحل مختلف چرخه تخمدانی نشان می‌دهد. بیان ژن *TLR4* در ایستموس اویداکت قرار گرفته در سمت تخمدان فعال (ipsilateral) در دوره پیش از تخم‌ریزی در بالاترین مقدار بود ($P < 0.05$) اما پس از تخم‌ریزی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). بیان ژن مذکور در ایستموس اویداکت در سمت تخمدان غیرفعال تحت تأثیر مراحل مختلف چرخه تخمدانی قرار نگرفت.

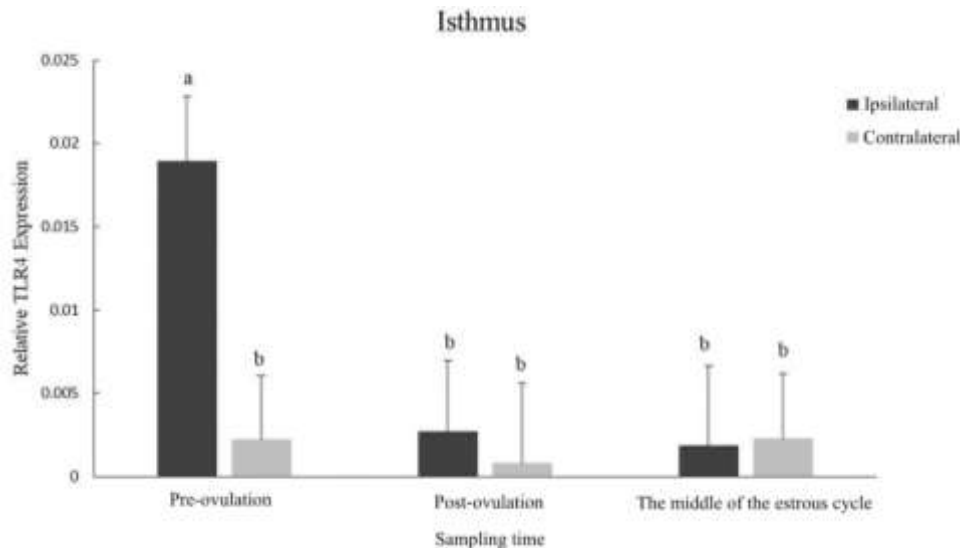
شکل ۳، تفاوت میزان بیان ژن *TLR4* را در ایستموس و آمپولای اویداکت قرار گرفته در سمت تخمدان دارای فولیکول آماده تخم‌ریزی نشان می‌دهد. به صورت کلی در اویداکت‌های قرار گرفته در سمت تخمدان دارای فولیکول آماده تخم‌ریزی، بیان ژن *TLR4* در ایستموس تقریباً پنج برابر بیشتر از آمپولا بود ($P < 0.05$).



شکل ۱. بیان ژن *TLR4* در آمپولای اویداکت گرفته در سمت تخمدان فعال (ipsilateral) یا تخمدان غیر فعال (contralateral) در مراحل مختلف چرخه تخمدانی گاو شیری هلشتاین.

Pre-ovulation: پیش از تخمک‌ریزی (۱ تا ۲ روز پیش از تخمک‌ریزی)؛ Post-ovulation: پس از تخمک‌ریزی (۱ تا ۲ روز پس از تخمک‌ریزی)؛ The middle of the estrous cycle: اواسط چرخه فحلی (۱۰ تا ۱۶ روز پس از تخمک‌ریزی).
a, b: حروف غیرهمسان، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

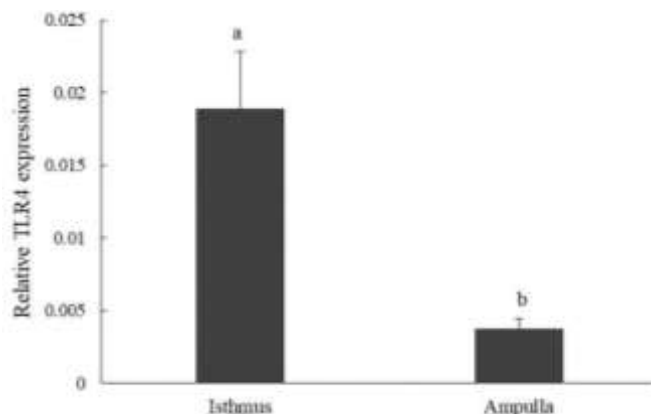
Figure 1. *TLR4* expression in ipsilateral and contralateral ampulla in different phases of estrus cycle. Pre-ovulation (1-2 days before ovulation); Post-ovulation (1 to 2 days after ovulation); The middle of the estrous cycle (10 to 16 days after ovulation).
a, b: Different letters indicate significant differences.



شکل ۲. بیان ژن *TLR4* در ایستموس اویداکت قرار گرفته در سمت تخمدان فعال (ipsilateral) یا تخمدان غیر فعال (contralateral) در مراحل مختلف چرخه تخمدانی گاو شیری هلشتاین.

Pre-ovulation: پیش از تخمک‌ریزی (۱ تا ۲ روز پیش از تخمک‌ریزی)؛ Post-ovulation: پس از تخمک‌ریزی (۱ تا ۲ روز پس از تخمک‌ریزی)؛ The middle of the estrous cycle: اواسط چرخه فحلی (۱۰ تا ۱۶ روز پس از تخمک‌ریزی).
a, b: حروف غیرهمسان، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

Figure 2. *TLR4* expression in ipsilateral and contralateral ampulla in different phases of estrus cycle. Pre-ovulation (1-2 days before ovulation); Post-ovulation (1 to 2 days after ovulation); The middle of the estrous cycle (10 to 16 days after ovulation).
a, b: Different letters indicate significant differences.



شکل ۳. مقایسه میزان بیان ژن *TLR4* در آمپولا (ampulla) و ایستموس (isthmus) اویداکت واقع در سمت تخمدان فعال (دارای فولیکول آماده تخم‌ریزی (ipsilateral)).

a, b: حروف غیرهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

Figure 3. *TLR4* expression in the ampulla and isthmus of the oviduct ipsilateral to the pre-ovulatory ovary.

a, b: Different letters indicate significant differences.

جدول ۲. برآورد مسیرهای سلولی فعال شده در اثر بیان ژن *TLR4* با استفاده از پایگاه داده ری‌اکتوم

Table 2. Detection of cell pathways activated by *TLR4* using Reactome database

Cell pathways	P-value
Apoptosis	0.09
Ligand-dependent caspase activation	0.02
Activated <i>TLR4</i> signaling	0.09
MyD88-independent <i>TLR4</i> cascade	0.09
TRIF-mediated programmed cell death	0.01
Caspase activation via extrinsic apoptotic signaling pathway	0.02
Programmed Cell Death	0.09
Regulation of TLR by endogenous ligand	0.02
Activation of IRF3/IRF7 mediated by TBK1/IKK epsilon	0.02
IKK complex recruitment mediated by RIP1	0.02
TRAF6-mediated induction of TAK1 complex within <i>TLR4</i> complex	0.01

ژن *TLR4* پس از تخم‌ریزی به شدت در آمپولا و ایستموس اویداکت‌های واقع در سمت تخمدان فعال کاهش داشت. به نظر می‌رسد که بیان این ژن تحت تأثیر مواد آزاد شده از فولیکول تخم‌ریزی، ترشحات اویداکتی و تغییر غلظت هورمون‌ها به خصوص پس از تخم‌ریزی قرار گرفته است (Zandieh et al., 2016). گزارش شده است که در گاو، غلظت هورمون استروژن در مایع اویداکت واقع شده در سمت تخمدان دارای فولیکول آماده تخم‌ریزی، ۱۰ تا ۵۰ برابر بیشتر از اویداکت قرار گرفته در سمت تخمدان غیر فعال (که فاقد فولیکول غالب است) است (Lamy et al., 2016). بنابراین، اثر ترکیبی هورمون‌های تولید مثلی پیش از تخم‌ریزی مثل افزایش غلظت استروژن، LH و ترکیباتی مثل پروستاگلاندین‌ها همراه با سطح پایین پروژسترون در مایع اویداکتی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن *TLR4* شود. با توجه به این‌که پس از

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن *TLR4* با استفاده از پایگاه داده‌ای ری‌اکتوم (www.reactome.org)، در جدول ۲ نشان داده است. آنالیز ری‌اکتومی نشان داد که بیان ژن *TLR4* مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی، از جمله مرگ سلولی (فعال‌سازی وابسته به لیگاند کاسپیز، فعال‌سازی کاسپیز از طریق مسیرهای مرگ سلولی بیرونی) و مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به *TLR4* (تنظیم TRL از طریق لیگاندهای درون‌زا) را به صورت معنی‌داری فعال می‌کند.

بحث

بیان ژن *TLR4* در آمپولا و ایستموس اویداکت‌هایی که در سمت تخمدان فعال (تخمدان دارای فولیکول چیره، تخمدان تخم‌ریزی کرده و یا تخمدان دارای جسم زرد بالغ)، در مراحل مختلف چرخه تخمدانی تغییرات معنی‌داری از خود نشان داد. به‌طوری‌که بیان

پیش از تخمک‌ریزی بیان ژن *TLR4* کاهش یافته اما در این زمان هنوز غلظت پروژسترون افزایش قابل توجهی پیدا نکرده است، بنابراین کاهش بیان ژن *TLR4* پس از تخمک‌ریزی می‌تواند بیشتر ناشی از کاهش در غلظت استروژن در مایع اویداکتی و کاهش در غلظت عمومی هورمون LH باشد. همچنین، سطح بیان ژن *TLR4* در میانه چرخه فحلی نسبت به مرحله پس از تخمک‌ریزی تغییری پیدا نکرد در صورتی که در این زمان جسم زرد در حال تولید مقادیر زیادی پروژسترون است (Henricks *et al.*, 1970). بنابراین، الگوی بیان ژن مذکور تحت تأثیر تغییرات غلظت پروژسترون قرار نگرفته است.

بیان زیاد ژن *TLR4* پیش از تخمک‌ریزی می‌تواند نشان‌دهنده آمادگی سیستم ایمنی برای پاسخ و مقابله با عوامل بیماری‌زا و خارجی راه یافته به این ناحیه و بروز پاسخ‌های التهابی باشد (Lu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). از سوی دیگر، کاهش بیان ژن *TLR4* پس از تخمک‌ریزی می‌تواند سبب کاهش حساسیت سیستم ایمنی اویداکت به عوامل خارجی شود؛ چرا که در زمان تخمک‌ریزی و پس از آن، محیط اویداکت باید آمادگی پذیرش اسپرم (که می‌تواند محرک سیستم ایمنی حیوان ماده باشد) و تخمک برای انجام فرآیند لقاح را داشته باشد (Mor & Cardenas, 2010). کاهش بیان ژن *TLR4* در این زمان می‌تواند موجب کاهش پاسخ‌های التهابی و کاهش حساسیت سیستم ایمنی شود (Lu *et al.*, 2008). پس از لقاح، محیط اویداکت هم‌چنان تا چند روز (۳-۵ روز برای گاو) پذیرای رویان تازه شکل گرفته است و نباید به آن به عنوان یک عامل خارجی پاسخ ایمنی نشان دهد (Havlicek *et al.*, 2005). این موضوع می‌تواند توجیهی بر کاهش بیان ژن *TLR4* در اویداکت به ویژه در اویداکتی که در سمت تخمدان دچار تخمک‌ریزی شده است، باشد. هرچند که کاهش بیان *TLR4* می‌تواند منجر به کاهش قدرت سیستم ایمنی و افزایش حساسیت حیوان به عوامل عفونی شود (Werner *et al.*, 2012).

پیش از تخمک‌ریزی در ایستموس پنج برابر بیشتر از آمپولا بود. با توجه به اینکه ایستموس اولین قسمت اویداکت و مجرای ورودی رحم به سمت تخمدان است، احتمال ورود عوامل بیماری‌زا و عفونی از سمت رحم به آن به مراتب بیشتر از دیگر قسمت‌ها است (Azawi, 2008). همچنین با توجه به این که تراکم سلول‌های ترش‌حی در ایستموس به مراتب بیشتر از آمپولا است (Joshi, 1988)، بنابراین می‌توان انتظار داشت که بیان بیشتر ژن *TLR4* در این قسمت از اویداکت، به آمادگی بیشتر در مقابله عوامل عفونی بینجامد. بایستی خاطر نشان کرد که پیش از تخمک‌ریزی، ایستموس محل ذخیره شدن و ظرفیت‌یابی اسپرم است که می‌تواند سیستم ایمنی حیوان ماده را تحریک کند (Suarez & Pacey, 2006). به‌طور طبیعی، در اثر فعالیت آنزیم هیالارونیداز موجود در اسپرم، غلظت اسید هیالورونیک افزایش می‌یابد (Shimada *et al.*, 2008). که به عنوان یک لیگاند درون‌زا و داخلی می‌تواند سبب فعال‌سازی *TLR4* شود (Taylor *et al.*, 2004). بر اساس این واقعیت و بیان زیاد *TLR4* در ایستموس این احتمال وجود دارد که *TLR4* در برخی از واکنش‌های فیزیولوژیک در پاسخ به حضور اسپرم هم نقش داشته باشد؛ هرچند برای تأیید این فرضیه، انجام آزمایش‌های بیشتری لازم است.

تحلیل و بررسی نتایج با استفاده از پایگاه داده‌های زیستی ری‌آکتوم (Joshi-Tope *et al.*, 2005)، در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۲، مسیرهای القاکننده مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و افزایش فعالیت سیستم ایمنی فعال شده‌اند. گزارش شده است که *TLR4* همراه با برخی از پذیرنده‌های دامنه مرگ (death domain receptors) از قبیل TNFR1، Fas/CD95 و TRAIL-R منجر به القای مرگ سلولی می‌شوند (Kroemer *et al.*, 2009). همچنین، افزایش بیان ژن *TLR4* به بهبود عملکرد سیستم ایمنی و افزایش حساسیت آن نسبت به عوامل بیماری‌زا و القای پاسخ مناسب کمک می‌کند (Lu *et al.*, 2008). افزایش بیان ژن *TLR4* از طریق فعال‌سازی عامل رونویسی NF- κ B منجر به القای سیتوکین‌های التهاب‌زا مثل TNF- α و IL1- β در

به صورت کلی، بیان ژن *TLR4* در ایستموس بیشتر از آمپولا بود؛ به‌ویژه این که بیان ژن مذکور

دارد. به طوری که بیان ژن *TLR4* در ناحیه ایستموس اویداکت واقع در سمت تخمدان دارای فولیکول آماده تخمک‌ریزی به مراتب بیشتر از آمپولای اویداکت همان سمت بود و با وقوع تخمک‌ریزی میزان بیان *TLR4* به شدت کاهش یافت. بنابراین، کاهش بیان *TLR4* در اویداکت پس از تخمک‌ریزی می‌تواند به حفظ شرایط مطلوب مورد نیاز برای انجام لقاح و رشد رویان کمک کند.

سپاسگزاری

از پروفیسور آکیو میاموتو (Akio MIYAMOTO) استاد دانشگاه کشاورزی و دامپزشکی ابیهیروی ژاپن بابت همکاری در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد. این مطالعه از لحاظ مالی توسط وزارت علوم تحقیقات و فن‌آوری جمهوری اسلامی ایران حمایت شد.

اویداکت شده است که این موضوع می‌تواند سبب آسیب به سلول‌های پوششی اویداکت شود (Kowsar *et al.*, 2013; Ault *et al.*, 1996; Hvid *et al.*, 2007). بنابراین، می‌توان انتظار داشت که با کاهش بیان ژن *TLR4* در اویداکت در دوره پس از تخمک‌ریزی، اویداکت نسبت به مرگ برنامه‌ریزی سلولی و القای بیان سیتوکین‌های التهاب‌زا حساسیت کم‌تری داشته باشد. این موضوع به حمایت از لقاح و رشد آغازین جنین کمک می‌کند. همچنین، این اتفاق می‌تواند به نوبه خود سبب افزایش آسیب پذیری اویداکت در برابر عوامل عفونت‌زا شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیان ژن *TLR4* در اویداکت گاو تحت تأثیر ساختارهای اویداکتی (آمپولا یا ایستموس) و وضعیت فیزیولوژیک تخمدان قرار

REFERENCES

1. Ault, K. A., Tawfik, O. W., Smith-King, M. M., Gunter, J. & Terranova, P. F. (1996). Tumor necrosis factor- α response to infection with *Chlamydia Trachomatis* in human fallopian tube organ culture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 175, 124-131.
2. Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105, 187-208.
3. Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A. K., Farber, J. M., Segal, D. M. & Oppenheim, J. J. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science*, 298, 1025-1029.
4. Bulek, K., Swaidani, S., Aronica, M. & Li, X. (2010). Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunology & Cell Biology*, 88, 257-268.
5. Chen, C., Zibiao, H., Ming, Z., Shiyi, C., Ruixia, L., Jie, W. & SongJia, L. (2014). Expression pattern of Toll-like receptors (TLRs) in different organs and effects of lipopolysaccharide on the expression of TLR 2 and 4 in reproductive organs of female rabbit. *Developmental & Comparative Immunology*, 46, 341-348.
6. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
7. Coy, P., Garcia-Vazquez, F. A., Visconti, P. E. & Aviles, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144, 649-660.
8. Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., et al. (2017). Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics*, 18, 142.
9. Havlicek, V., Lopatarova, M., Cech, S., Dolezel, R., Huber, T., Pavlok, A., Brem, G. & Besenfelder, U. (2005). In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of in vivo vs. in vitro produced embryos. *Veterinary Medicine-Czech*, 50, 149-157.
10. Henricks, D., Dickey, J. & Niswender, G. (1970). Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. *Biology of Reproduction*, 2, 346-351.
11. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S. & Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168, 4531-4537.
12. Hvid, M., Baczynska, A., Deleuran, B., Fedder, J., Knudsen, H. J., Christiansen, G. & Birkelund, S. (2007). Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during *Chlamydia trachomatis* infection. *Cellular Microbiology*, 9, 2795-2803.
13. Ibrahim, S., Salilew-Wondim, D., Rings, F., Hoelker, M., Neuhoff, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. & Tesfaye, D. (2015). Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory micrnas in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: implication for early embryonic development. *PLoS One*, 10:3, e0119388.

14. Ireland, J. J., Murphee, R. L. & Coulson, P. B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *Journal of Dairy Science*, 63, 155-160.
15. Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., Jassal, B., Gopinath, G. R., Wu, G. R., Matthews, L., Lewis, S., Birney, E. & Stein, L. (2005). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Research*, 33, 428-432.
16. Joshi, M. (1988). Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 249-261.
17. Jupe, S., Fabregat, A. & Hermjakob, H. (2015). Expression data analysis with Reactome. *Current Protocols in Bioinformatics*, 49, 1-9.
18. Kölle, S., Reese, S. & Kummer, W. (2010). New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology*, 73, 786-795.
19. Kowsar, R., Hambruch, N., Liu, J., Shimizu, T., Pfarrer, C. & Miyamoto, A. (2013). Regulation of innate immune function in bovine oviduct epithelial cells in culture: the homeostatic role of epithelial cells in balancing Th1/Th2 response. *Journal of Reproduction and Development*, 59, 470-478.
20. Kowsar, R., Jiemtaweboon, S., Shirasuna, K., Shimizu, T., Sasaki, M., Kitamura, N. & Miyamoto, A. (2014). Accumulation of eosinophils in the infundibulum of the bovine oviduct just after ovulation. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 1231-1234.
21. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P. & Green, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*, 16, 3-11.
22. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388, 621-625.
23. Lamy, J., Liere, P., Pianos, A., Aprahamian, F., Mermillod, P. & Saint-Dizier, M. (2016). Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*, 86, 1409-1420.
24. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151.
25. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1, 135-145.
26. Mor, G. & Cardenas, I. (2010). The immune system in pregnancy: A unique complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63, 425-433.
27. Netea, M. G., Van der Meer, J. W. & Kullberg, B. J. (2004). Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends in Microbiology*, 12, 484-488.
28. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. & Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164, 558-561.
29. O'Neill, L. A. J. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*, 18, 3-9.
30. Robertson, S. A., Chin, P. Y., Femia, J. G. & Brown, H. M. (2018). Embryotoxic cytokines-Potential roles in embryo loss and fetal programming. *Journal of Reproductive Immunology*, 125, 80-88.
31. Schleimer, R. P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D. & Avila, P. C. (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 1279-1284.
32. Shimada, M., Yanai, Y., Okazaki, T., Noma, N., Kawashima, I., Mori, T. & Richards, J. S. (2008). Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development*, 135, 2001-2011.
33. Suarez, S. S. & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12, 23-37.
34. Swamy, M., Jamora, C., Havran, W. & Hayday, A. (2010). Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nature Immunology*, 11, 656-665.
35. Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C. & Gallo, R. L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 17079-17084.
36. Verthelyi, D. (2001). Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *International Immunopharmacology*, 1, 983-993.
37. Watanabe, S., Shirasuna, K., Matsui, M., Yamamoto, D., Berisha, B., Schams, D. & Miyamoto, A. (2006). Effect of intraluteal injection of endothelin type A receptor antagonist on PGF_{2α}-induced luteolysis in the cow. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 551-559.
38. Werner, J., Decarlo, C. A., Escott, N., Zehbe, I. & Ulanova, M. (2012). Expression of integrins and Toll-like receptors in cervical cancer: effect of infectious agents. *Innate Immunity*, 18, 55-69.
39. Zandieh, Z., Amjadi, F., Ashrafi, M., Aflatoonian, A., Fazeli, A. & Aflatoonian, R. (2016). The effect of estradiol and progesterone on toll like receptor gene expression in a human fallopian tube epithelial cell line. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17, 678-691.