دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله‌پژوهشی "

تأثیر علف‌کش رانداَپ بر بیان نسبی ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی استرویید سازی و متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR در تکامل برون تنی اووسایت بز

مایده غلامی[۱]، حمید دلدار[۲]، زربخت انصاری پیرسرایی[۳] و علی برزگر[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲- دانشیار گروه علوم دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، (نویسنده مسوول: h.deldar@sanru.ac.ir)
۳- دانشیار گروه علوم دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۸
صفحه: ۹۴ تا ۱۰۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: همزمان با افزایش جمعیت و نیاز به تولید بیشتر مواد غذایی، آفت‌کش‌ها برای کنترل آفات و بیماری‌ها در دام و محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما متاسفانه، استفاده‌ی بی رویه از آفت‌کش‌ها، باعث صدمه به محیط زیست و گیاهان، حیوانات، آب، زمین و خاک شده است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت علف‌کش رانداَپ به‌عنوان آفت‌کش پرکاربرد و رایج کشاورزی، بر تکامل برون تنی اووسایت بز انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای تهیه‌ی اوو سایت‌های بز، تخمدان‌ها بلافا صله بعد از ک شتار، از لا شه‌ی دام جدا و درون فلا سک حاوی سرم فیزیولوژیک در دمای ۳۴-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. مجموعه اوو سایت-کومولوس با روش بر شی از فولیکول‌های آنترال کوچک (۲ تا ۶ میلیمتر) تخمدان جدا و در محیط تکامل اووسایت به‌همراه غلظت‌های متفاوت علف‌کش رانداَپ کشت داده شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های متفاوت علف‌کش رانداَپ که در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۸۷/۵ میکرومولار (تیمار با دز نصف نیمه کشنده) ،۳۷۵ میکرومولار (تیمار با دز نیمه کشنده) و ۷۵۰ میکرومولار (تیمار با دز کشنده) به محیط‌های تکامل اووسایت‌های بز افزوده شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش ن شان داد که افزودن غلظت‌های متفاوت علف‌کش رانداَپ باعث کاهش معنی‌دار نرخ تکامل برون تنی اوو سایت‌ها در تیمارهای مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد شد ($p<$ ۰/۰۵)، هم چنین بیان نسبی ژن‌های استروئیدساز در سلول‌های کومولوس به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت؛ اما تیمارهای رانداَپ تأثیر قابل توجهی در میزان متیلا سیون DNA پروموتر ژن StAR ندا شت. بنابراین احتمال دارد، تأثیر علف‌کش رانداَپ در کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی، از طریق دیگر مکانیسم‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن باشد.

نتیجه‌گیری: اثرگذاری تیمار با در ۱۸۷/۵ میکرومولار، در کاهش بیان نسبی ژن‌های StAR، CYP11A1 و CYP19 نسبت به تیمار نیمه کشنده، بیشتر بود که این می‌تواند به این علت باشد که تخریب کننده‌های هورمونی (آلاینده‌های زیست محیطی) دارای اثرات زیستی قوی در غلظت‌های کم هستند اما در غلظت‌های زیاد دارای اثرات ضعیف و یا بدون اثر هستند.

واژه‌های کلیدی: تکامل برون تنی اووسایت، علف‌کش رانداَپ، کمپلکس اووسایت کومولوس، متیلاسیون DNA

مقدمه

تکامل برون تنی اووسایت فرآیندی است که طی آن اووسایت‌های پوشیده با سلول‌های کومولوس برای تکامل، در محیط‌های فیزیولوژی ویژه‌ای قرار داده می‌شوند. سلول‌های کومولوس به وسیله‌ی نگه داشتن اووسایت‌ها در مرحله‌ی توقف میوزی، القای از سرگیری میوز و تکامل سیتوپلاسمی، نقش مهمی در تکامل اووسایت‌ها دارند (۱۵). هر گونه تغییر در محیط کشت تکامل برون تنی (وجود سموم شیمیایی) رشد و نمو جنین، شمار سلول‌های بلاستوسیست و مرگ خود به خودی سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

ارتباط بین سلول‌های کومولوس و اووسایت، ارتباطی دو طرفه است که برای نمو و عملکرد هر دو نوع سلول حیاتی است. با توجه به این ارتباط دو طرفه تغییراتی که نمو سلول اووسایت را تحت تأثیر قرار می‌دهد، می‌تواند روی فنوتیپ و بیان ژن سلول‌های کومولوس نیز اثر بگذارد (۵). سموم شیمیایی باعث ایجاد تغییرات در رفتار تولید مثلی، کاهش باروری، سقط، عقب ماندگی رشد، مرگ نوزاد و پس روی تخمدان می‌شوند (۲۵). هم چنین این مواد شیمیایی در انسان باعث مسمومیت کوتاه و بلند مدت، سرطان‌زایی، ایجاد جهش و عقیمی می‌شود. حیوانات اهلی (از جمله گوسفند و دیگر نشخوار کنندگان) ممکن است با گذشت زمان در معرض غلظت‌های متفاوت آلاینده‌های زیست محیطی قرار گیرند، که این امر باروری دام را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). کاماریانوس و همکاران (۱۸)، غلظت‌های متفاوتی از آفت‌کش هگزا کلرو هگزان را در مایع فولیکولی گاو، گوسفند، بز و خوک مشاهده کردند؛ هم چنین نشان دادند که وجود آلاینده‌های زیست محیطی در مایع فولیکولی می‌تواند سلول‌های گرانولوزا و هم چنین اووسایت را تحت تاثیر قرار دهد، به‌طوری که قرار گرفتن سلول‌های گرانولوزا گاو در غلظت‌های متفاوت ترکیبات ارگانوکلره در شرایط برون تنی، باعث کاهش معنی‌داری در ترشح پروژسترون می‌شود. پژوهش زینگ و همکاران (۳۱) نشان داد که رانداَپ باعث اختلال در تکامل اووسایت خوک می‌شود. همچنین میزان بیان ژن‌های درگیر در گسترش کومولوس را تحت تاثیر می‌دهد. اثرات تخریبی رانداَپ، از طریق تخریب عملکرد میتوکندریایی اعمال می‌شود که منجر به تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و استرس اکسیداتیو می‌شود، که همچنین با کاهش میزان بیان mRNA ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در ارتباط است.

آفت‌کش‌ها، در غلظت‌هایی کمتر از غلظت مورد نیاز برای آسیب به سلول، باعث آسیب به DNA می‌شوند، که این نشان‌دهنده‌ی این است که به جای نتیجه‌ی غیر مستقیم آسیب سلولی، آسیب به DNA به صورت مستقیم توسط این مواد صورت می‌گیرد (۲۰). رانداَپ با نام عمومی گلایفوسیت (GlyPhosate) با نام شیمیایی N-(PhosPhonomethyl) glycine،

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

۱۶۹ دارای نیمه عمر حدود ۲۱– ۴۲ روز تأثیر بسیار زیادی در کنترل علف‌های هرز یکساله و تعداد زیادی از گیاهان علفی چند ساله دارد (۱۲). پژوهش‌هایی به‌منظور شناسایی مسیرهایی که گلایفوسیت دارای اثرات سمی روی سلول‌های انسان و حیوانات در شرایط برون تنی (in vitro) هستند انجام گرفت. از جمله این مسیرها شامل تخریب‌کننده‌های غدد درون‌ریز که به‌عنوان "Hormone Hacking" توصیف می‌شوند. تخریب‌کننده‌های غدد درون‌ریز می‌توانند منجر به بیماری‌های جدی مانند نقص‌های مادرزادی، سرطان و مشکلات در رشد و باروری شوند (۲۳). در شرایط برون تنی آسیب به DNA در سلول‌های دهانی افرادی که تنها ۲۰ دقیقه در معرض غلظتی بسیار پایین‌تر از غلظت راندآپ و گلایفوسیت (که در کشاورزی استفاده می‌شود) قرار داشتند، مشاهده شد. این پژوهش نشان داد که افرادی که از طریق استنشاق در معرض راندآپ قرار داشتند (کشورهای تولید کننده‌ی سویا در آمریکای جنوبی) احتمالاً دچار آسیب به DNA شدند. گلایفوسیت و راندآپ در شرایط درون تنی (in vivo)، باعث آسیب به DNA و کروموزوم در مغز استخوان موش و در سلول‌های انسانی در شرایط برون تنی می‌شوند (۲۰).

اپی ژنتیک مکانیسم‌های مبتنی بر کروماتین است که رونویسی از ژن را تغییر می‌دهد، بدون این که در توالی DNA تغییری ایجاد کند. تاکنون مسیرهای اپی ژنتیک متعددی شناسایی شده است که بدون ایجاد تغییر در توالی DNA، بیان ژن‌ها را به صورت پایدار تغییر می‌دهند. قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های زیست محیطی باعث ایجاد تغییرات اپی ژنتیک می‌شود (۱۳). از جمله این تغییرات، متیلاسیون DNA است که به طور مستقیم بیان ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد که آفت‌کش‌ها باعث تغییر متیلاسیون DNA در ناحیه‌ی پروموتر ژن‌ها می‌شوند (۳). بر این اساس در این پژوهش تأثیر افزودن علف‌کش راندآپ به‌عنوان سم رایج کشاورزی در محیط تکامل برون تنی اووسایت، بر نرخ تکامل اووسایت و بیان نسبی ژن‌های استرویید سازی در سلول‌های کومولوس و هم چنین متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR مورد بررسی قرار گرفت.

از مجموع ۶۵۰ نوع آفت، بیماری و علف هرز موجود در کشور، ۶۶ درصد کل آفات کشور در استان مازندران یافت می‌شود، به همین علت میزان مصرف سموم کشاورزی کشور در اراضی زراعی و باغی استان مازندران پنج برابر سرانه کشوری است. با توجه به بالا بودن میزان مصرف آفت‌کش‌ها در استان مازندران و همبستگی بین مصرف سموم کشاورزی و مشکلات تولید مثلی مانند افزایش سقط خود به خودی در زنان باردار شاغل در گلخانه (۱۶)، افزایش ناهنجاری‌های مادرزادی مانند کریپتورکیدیسم (۱) و تعویق در زمان باردار شدن پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر نامطلوب غلظت های متفاوت علف‌کش راندآپ به‌عنوان سم رایج کشاورزی بر نرخ تکامل برون تنی اووسایت‌های بز، بیان نسبی ژن‌های استرویید سازی و هم چنین بررسی تأثیر بر متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR به‌عنوان مکانیسمی در کاهش بیان ژن‌ها، طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی تولید مثل دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری از فروردین ماه سال ۹۴ تا مرداد ماه سال ۹۵ انجام شد. ترکیبات و مواد مورد استفاده از شرکت سیگما و گیبکو خریداری شدند. پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی غلظت‌های متفاوت علف‌کش راندآپ بودند که بر اساس پیش آزمایش انجام شده تعیین شدند، و در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۷۵۰ میکرومولار که تیمار با غلظت کشنده، ۳۷۵ میکرومولار که تیمار با غلظت نیمه کشنده (LC 50[1]) ۱۸۷/۵ میکرومولار (تیمار با دز نصف نیمه کشنده) به محیط کشت اووسایت اضافه شدند. هم چنین تیماری با غلظت ۳/۷۵ میکرومولار از علف‌کش راندآپ (۰/۰۱ غلظت نیمه کشنده) برای بررسی میزان متیلاسیون ژن StAR در نظر گرفته شد.

جمع آوری، آماده سازی و بلوغ برون تنی اووسایت

تخمدان‌های بز از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری شدند و پس از جمع‌آوری، درون فلاسک آب در دمای ۳۰ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. تخمدان‌ها در سرم فیزیولوژیک که شامل ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در هر لیتر است، شستشو شدند. مجموعه اووسایت–کومولوس به روش برشی از فولیکول‌های آنترال (۶–۲ میلی‌متر) تخمدان جمع‌آوری شدند. مجموعه اووسایت–کومولوس‌هایی که دارای چند لایه سلول‌های کومولوس و با سیتوپلاسم یکنواخت بودند انتخاب و به کمک میکروسکوپ تشریحی ۴ الی ۵ بار در محلول SOF[2] HEPES شستشو شدند (۹)، شستشوی پایانی (۴–۳ بار) در محیط تکامل اووسایت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر پلیت ۶۰×۱۵ میلی لیتری ۱۱ قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت تکامل اووسایت گذاشته، و روی قطره‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر روغن معدنی پوشانیده شد. پلیت حاوی قطره‌های تکامل اووسایت قبل از قراردادن مجموعه‌های اووسایت‌کومولوس درون آن، به‌مدت ۲–۱ ساعت در انکوباتور دارای CO_2 ۵ درصد، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت ۹۸ درصد قرار داده شد.

هر ۱۱–۹ مجموعه اووسایت–کومولوس به درون قطره ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت انتقال یافتند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.

مجموعه اووسایت–کومولوس پس از ۲۴ ساعت از قطره‌های محیط کشت به محیط SOF HEPES منتقل شدند و پس از شست وشوی آن‌ها با SOF HEPES، برای اندازه‌گیری نرخ تکامل اووسایت، سلول‌های کومولوس از اووسایت به وسیله‌ی آنزیم هیالورونیداز جدا شده. بر اساس دیدن جسم قطبی، نرخ اووسایت‌هایی که به مرحله متافاز میوز II (اووسایت‌های تکامل یافته) رسیدند، مشخص شد.

جداسازی RNA و ساخت cDNA

از کیت RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74104) برای جداسازی RNA کل استفاده شد. این کیت دارای سه

1- Lethal Concentration
2- Base Oviduct Fluid

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

محلول (RW1،RLT و RPE)، آب RNase free، تیوپ جمع‌کننده و ستون (RNeasy Mini Column) است. برای جداسازی RNA، کومولوس حداقل ۱۰۰ اووسایت (نمونه) مورد استفاده قرار گرفت. RNA کل نمونه‌های جدا شده تا زمان ساختن cDNA در ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد. برای ساخت cDNA از کیت Quanti NovaTM Reves TranscriPtion استفاده شد. اجزای کیت شامل BuffergDNA WiPeout, RT Primer Mix QuantiscriPt RTBuffer ,QuantiscriPt Reverse TransecriPtase و آب RNase free بوده. cDNA ساخته شده برای بیان نسبی ژن‌های مورد نظر تا زمان انجام واکنش‌های Real Time PCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

واکنش Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت Real-time PCR در دستگاه چرخه حرارتی با تابش نوری کوربت (Corbett) انجام شد.

Quantitative Real-time PCR

از روش Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) به‌منظور تعیین بیان نسبی ژن‌های CYP11A1، βHSD۱۷، CYP19، وStAR در سلول‌هی کومولوس بز به کار گرفته‌شد. واکنش qRT-PCR با استفاده از کیت شرکت Qiagen و در واکنش‌های ۲۰ میکرولیتری توسط دستگاه Rotor gene 6000 ساخت شرکت Corbett Research انجام شد، که هر واکنش شامل یک میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر از محلول مسترمیکس، نیم میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و ۸ میکرولیتر dH_2O بود. برنامه حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مراحل پیش رو انجام گرفت:

مرحله واسرشته سازی اولیه شامل یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه و چسبیدن آغازگرها و تکثیر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. منحنی دمای ذوب با استفاده از افزایش تدریجی ۰/۱ درجه سانتی‌گراد در ثانیه تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، برای اطمینان از اختصاصی بودن محصول تولیدی هر ژن رسم شد. برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (CT در دستگاه Real-time PCR) تعیین شد و برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش Livak استفاده شد. بیان ژن YWHAZ به‌عنوان ژن نرمال سازی مورد استفاده قرار گرفت. تیمار شاهد به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. برای ایجاد منحنی استاندارد از سری رقت‌های با ضریب 10^{-1} به گونه‌ای استفاده شد که غلظت cDNA در استاندارد شماره ۵ به مقدار 10^{-5} برابر کمتر از استاندارد نخست بود. در انتها محصول PCR، جهت تایید صحت انجام واکنش، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

آنالیز آماری داده‌های حاصل از بیان ژن با استفاده از نرم افزار SAS[1] (نسخه ۹/۱) انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از رویه GLM[2] استفاده شد. هنگامی که آنالیز داده‌ها معنی‌دار شد، آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مجزا به کار برده شد. احتمال وجود داشتن تفاوت معنی‌دار در میانگین تیمارهای گوناگون با آزمون دانکن کوچک‌تر مساوی با ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای داده‌های درصدی تبدیل داده Arc sin صورت گرفت و سپس آنالیز شدند. مدل آماری استفاده شده (طرح کاملا تصادفی) به شرح زیر است:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این رابطه، Y_{ij} مقدار عددی تکرار j ام از تیمار i ام، μ میانگین داده، T_i اثر تیمار i و e_{ij} اثر عوامل باقیمانده است.

بی‌سولفیت کردن DNA برای اندازه‌گیری میزان متیلاسیون

DNA ژنومی از تعداد ۱۵۰ سلول کومولوس در هر تیمار با استفاده از کیت EPiTect Bisulfite شرکت کیاژن استخراج شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش بی‌سولفیت، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فرآیند بی‌سولفیته کردن DNA با استفاده از کیت EPiTect Bisulfite Kit از شرکت کیاژن انجام شد. تیمار بی‌سولفیت، سیتوزین‌های غیرمتیله را به یوراسیل تبدیل می‌کند، این تغییر در سیتوزین‌های متیله اتفاق نمی‌افتد. بنابراین متیلاسیون DNA را می‌توان براساس سیتوزین‌های تغییر نیافته در نواحی غنی از CPG شناسایی کرد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR، ۱۱ ناحیه CPG در جایگاه پروموتر ژن StAR مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان متیلاسیون ناحیه‌ی پروموتر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷).

(100 * C/ (C+T) (C نشانگر باز سیتوزین و T نشانگر باز تیمین است).

نتایج و بحث

تأثیر علف‌کش راندآپ بر تکامل برون تنی اووسایت بز و بیان نسبی ژن‌های CYP11A1، 17βHSD، CYP19، و ژن StAR در سلول‌های کومولوس

با افزایش غلظت علف‌کش راندآپ، نرخ بلوغ اووسایت نسبت به گروه شاهد کاهش معنا داری را نشان داده است (شکل ۱). نتایج این پژوهش با یافته‌های کاساس و همکاران (۸) مطابقت داشت. در خلال فرآیند رشد و نمو اووسایت، ارتباط تنگاتنگی بین اووسایت و سلول‌های اطراف آن (سلول‌های کومولوس) وجود دارد. وظیفه سلول‌های کومولوس فراهم کردن مواد غذایی از راه پیوندهای شکافدار است که ارتباط بین سلول‌های کومولوس با اووسایت و بین سلول‌های کومولوس را فراهم می‌کند (۲۳). وجود سلول‌های کومولوس برای تکامل نهایی هسته و سیتوپلاسم لازم است و روی رشد و نمو اووسایت تأثیر گذار است (۲۸). بر اساس این ارتباط تنگاتنگ بین اووسایت و سلول‌های کومولوس این فرضیه ایجاد شده است که سلول‌های کومولوس ممکن است هدفی برای آسیب‌های سموم شیمیایی در خلال تکامل اووسایت محسوب شود (۲۰). در ارتباط بین سلول‌های کومولوس و اووسایت‌ها ترکیبات گوناگونی از راه پیوندهای شکافدار جابجا می‌شوند. در موش، باروری اووسایت‌های بدون سلول‌های کومولوس، به وسیله ترکیبات سمی تحت تأثیر قرار نگرفت؛ اما باروری در رشد و نمو رویان‌هایی که از اووسایت‌های کومولوس‌دار ایجاد شده بود، به شدت کاهش یافت. همچنین گزارش کردند که غلظت‌های ارگانو کلره‌ها، بر فولیکول سازی و تکامل اووسایت در زنان و سایر پستانداران اثر منفی دارد (۱۸،۲۱).

1-SAS. 2006. Statistical analysis system ProPrietary software release 9.1. SAS Inst. Inc

2- Linear ModelGeneral

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در Real-time PCR

Table 1. Details of Primers used for Real-time PCR

Gene name نام ژن	Accession number شماره دسترسی	Primer sequence: 5′→3′: Forward/Reverse آغاز گر رفت و برگشت	Product length (bP) اندازه محصول PCR
StAR	NM_001009243.1	Forward: 5′-GGAGAGCCGGCAGGTCAATG-3′ Reverse: 5′-CTTCTGCAGGACCTTGATCTCCTTG-3′	184
CYP11A1	NM_001093789.1	Forward: 5′- AGAGAATCCACTTTCGCCACATC-3′ Reverse: 5′- GGTCTTTCTTCCAGGTTCCTGAC-3′	237
βHSD17	XM_012133450.2	Forward: 5′- TGGGAGAATGGGCAGTGATC-3′ Reverse: 5′- TGTTAAGGAAATGGCTTGGG-3′	297
CYP19	NM_001123000.1	Forward: 5′- TCGTGGTTAAAATCCAGGGG-3′ Reverse: 5′- TCATTGCCTCTTCAACCTGG-3′	360
YWHAZ	NM_001267887.1	Forward: 5′- TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT-3′ Reverse: 5′- TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT-3′	115

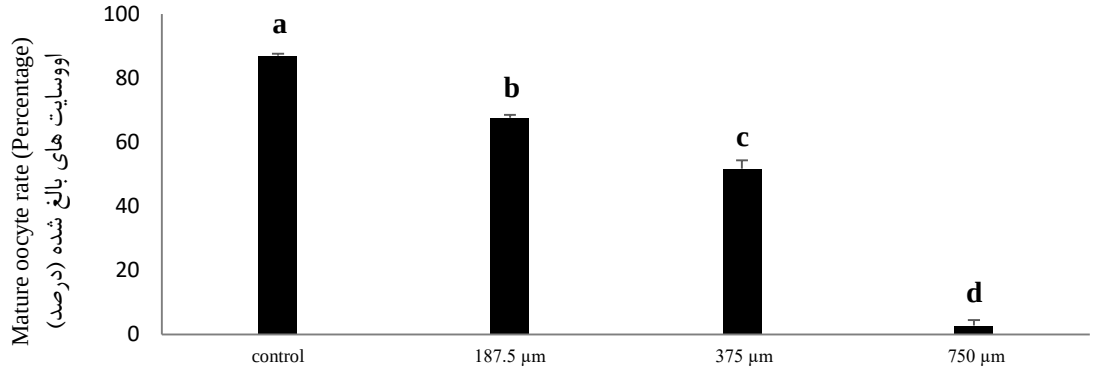
جدول ۲- آغازگر مورد استفاده در واکنش PCR متیلاسیون DNA

Table 2. PCR Primer used in DNA Methylation reaction

Gene name نام ژن	Primer sequence: 5′→3′: Forward/Reverse آغاز گر رفت و برگشت	CG%	Product length (bP) اندازه محصول PCR
StAR	Forward: 5′- GGAAGGGATAGTTAGGAAGTTTGAGATAG -3′ Reverse: 5′- CACCAAAAACACTCTACCCAAACCTATTC -3′	41.4	434

همچنین قرار گرفتن در معرض ارگانوکلره‌ها طی تکامل برون تنی، اثر منفی روی اووسایت خوک داشت (۷). این سموم روی پیوندهای شکافدار بین سلول‌های کومولوس تأثیر گذار هستند. تنظیم cAMP[1] که در میتوز اووسایت‌های خوک نقش دارد به وسیله پیوندهای شکافدار بین سلول‌های کومولوس ایجاد می‌شود. بر این اساس عملکرد سلول‌های کومولوس و در پی آن غلظت cAMP اووسایت و تکامل آن تحت تأثیر سموم شیمیایی قرار می‌گیرد (۱۱).

نتیجه به دست آمده در این پژوهش با نتایج پژوهش استوکر و همکاران (۲۷) مطابقت داشت. این پژوهشگران بیان کردند علف‌کش آترازین می‌تواند باعث تأخیر در تکامل موش صحرایی ماده شود.

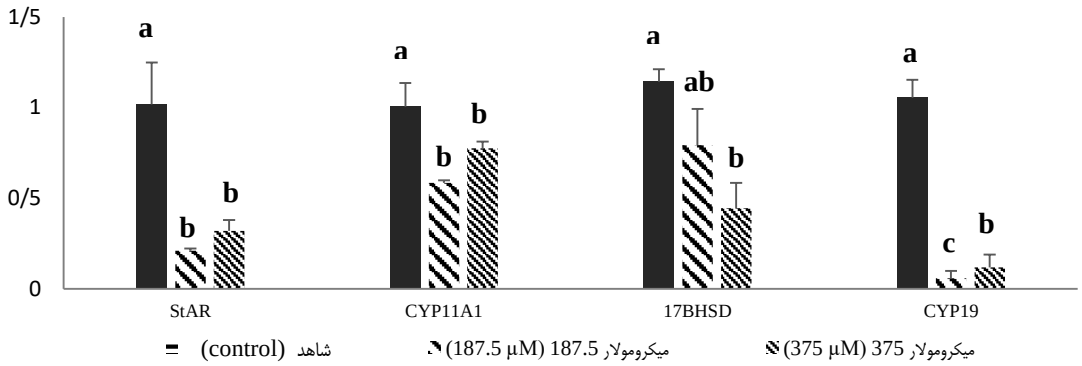


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های متفاوت راندآپ بر نرخ تکامل برون‌تنی اووسایت بز. حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 1. Effect of different concentrations of herbicide RounduP on maturation rate of goat oocytes. Different letters indicate significant differences between grouPs ($p<0.05$).

1- Cyclic adenosine monoPhosPhate

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های متفاوت علف‌کش راندآپ بر بیان نسبی ژن‌های StAR، CYP11A1، 17BHSD و CYP19 در سلول‌های کومولوس. حروف نامشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

Figure 2. Effect of different concentration of herbicide RounduP on StAR, CYP11A1, 17BHSD and CYP19 gene exPression in goat oocytes. Different letters indicate significant differences between grouPs ($p<0.05$).

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های متفاوت علف‌کش راندآپ بر متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR در سلول‌های کومولوس (اعداد وارد شده در جدول به درصد هستند). اعداد ۱ تا ۱۱ نشان‌دهنده‌ی CPGهای بررسی شده در جایگاه پروموتر هستند

Table 3. The effect of herbicide RounduP on DNA methylation of Promoter site of StAR gene in cumulus cells (The numbers in table are based on the Percentage). Numbers 1 to 11 indicate the examined CPGs in the Promoter region

11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	شماره جایگاه (Position number)
66.5	86.9	96.2	92.5	89.2	88.2	87.8	90.9	72.5	87.1	84.8	شاهد (Control)
67	81	93.3	89.9	81.8	86.5	85	89.1	73.3	91.9	79.6	375 µm
59.5	83.9	95.2	93	86.7	88.4	83.8	90.9	75.2	88.8	77.6	187.5 µm
51.1	82.5	89	89.1	83.9	83.6	85.5	89.5	71	91.8	80.2	3.75 µm

قرار گرفتن گاومیش در معرض آفت‌کش، باعث اختلالات چرخه‌ی تولید مثلی، کاهش باروری، سقط و مرده زایی می‌شود (۶). همچنین پژوهش‌های دیگر نشان داد که آفت‌کش‌ها باعث تغییر در رفتار تولید مثلی، ناباروری و سقط در انسان می‌شوند (۲).

پژوهش‌ها نشان دادند که بسیاری از آفت‌کش‌ها در حال حاضر باعث اختلال در تولید مثل حیوانات می‌شوند. اگر چه این اختلال باروری معمولاً با تغییرات در میزان سرمی هورمون استروئید، اختلال در اسپرماتوژنز و از کاهش باروری مشخص می‌شود. پژوهش نشان داد که راندآپ با اختلال در بیان ژن StAR، باعث کاهش استروئید سازی و باروری در انسان شد. همچنین این سم با مهار استروئیدوژنز، فعالیت آنزیم P450scc را کاهش داد (۲۹)، بر این اساس نتیجه بدست آمده در این پژوهش با نتایج پژوهش والش و همکاران (۲۹) هم خوانی داشت. همچنین با نتایج پژوهش بلو و همکاران (۴) که نشان داد قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌هایی مانند DBP[1] به مدت ۳۰ روز و از طریق غذا، باعث بهم ریختن آنزیم‌های درگیر در استروئیدسازی از جمله پروتئین StAR، آنزیم سیتوکروم P450scc، CYP17، CYP19 و 3β-HSDدر بلدرچین‌های بالغ ژاپنی می‌شود، هم‌خوانی مشاهده شد.

اثرگذاری تیمار با دز نصف نیمه‌کشنده (غلظت ۱۸۷/۵ µM)، در کاهش بیان نسبی ژن‌های StAR، CYP11A1 و CYP19 نسبت به تیمار نیمه کشنده (غلظت ۳۷۵ µM)، بیشتر بود. در حالی که بیان نسبی این ژن‌ها در تیمار نیمه کشنده نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. اما کاهش بیان نسبی این ژن‌ها در تیمار نیمه کشنده نسبت به تیمار نصف نیمه کشنده کمتر بود. از طرفی تخریب‌کننده‌های هورمونی (آلاینده‌های زیست محیطی) دارای اثرات زیستی قوی در غلظت‌های کم هستند اما در غلظت‌های زیاد دارای اثرات ضعیف و یا بدون اثر هستند (۳۰). بنابراین در مورد ژن‌های StAR، CYP11A1 و CYP19 می‌توان احتمال داد که غلظت ۱۸۷/۵ میکرومولار از علف‌کش راندآپ دارای اثرگذاری بیشتری نسبت به غلظت ۳۷۵ میکرومولار است.

تأثیر غلظت‌های متفاوت علف‌کش راندآپ بر میزان متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR در جدول ۳-نشان داده شده است. با توجه به آن چه در جدول آورده شده، درصد متیلاسیون پروموتر ژن StAR در تیمار با دز ۳۷۵ میکرومولار از سم، نسبت به تیمار شاهد تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. اما در تیمار با ۱۸۷/۵ میکرومولار کشنده از سم، درصد متیلاسیون در CPG شماره ۱، ۷۷/۶ درصد و در تیمار شاهد ۸۴/۸ درصد بود. هم چنین در این تیمار، درصد متیلاسیون در CPG شماره ۱۱، ۵۹/۵ درصد و در تیمار شاهد ۶۶/۵ درصد مشاهده شد. همچنین در تیمار ۳/۷۵ میکرومولار از سم، در ناحیه CPG شماره ۱۱، کاهش درصد متیلاسیون نسبت به تیمار شاهد (به‌ترتیب ۵۱/۱ درصد متیلاسیون در مقابل ۶۶/۵ درصد) مشاهده شد.

گرفتن در معرض آلاینده‌های زیست محیطی باعث ایجاد تغییرات اپی ژنتیک می‌شود (۱۳). از جمله‌ی این مسیرها متیلاسیون DNA است که شامل انتقال یک گروه متیل از S- آدنوزیل متیونین (SAM) به اتم شماره پنج از باز آلی سیتوزین است که توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز (Dnmt) صورت می‌گیرد (۱۰).

پژوهش شوتوه و همکاران (۲۶) نشان داد که سم DDT[2] باعث کاهش بیان Dnmt در هیپوتالاموس موش صحرایی جنس نر شد. همچنین آنالیز PCR DNA متیله شده نشان داد که در شش CPG که مورد بررسی قرار گرفت، نسبت به تیمار شاهد، به طور معنی‌داری کاهش متیلاسیون مشاهده شد. کاهش متیلاسیون مشاهده شده در CPG های متفاوت ناحیه پروموتر از طریق کاهش فعالیت Dnmt است. بر این

1- Di-n-butyl Phthalate
2- DichlorodiPhenyltrichloroethane

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

اساس نتیجه بدست آمده در این پژوهش با نتایج شوتوه و همکاران (۲۶)، مطابقت داشت.

منحنی پاسخ به غلظت آلاینده‌ها با متیلاسیون، کاملاً خطی نیست (۱۹). بر این اساس با توجه به درصد متیلاسیون CPG شماره ۱۱ تیمار با غلظت ۳/۷۵ میکرومولار در مقایسه با درصد متیلاسیون همین CPG در تیمار با غلظت ۱۸۷/۵ میکرومولار، در مورد ژن StAR ممکن است که غلظت ۳/۷۵ میکرومولار از علف‌کش راندآپ دارای اثرگذاری بیشتری نسبت به غلظت ۱۸۷/۵ میکرومولار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن غلظت‌های متفاوت علف‌کش راندآپ نرخ تکامل برون تنی اووسایت‌ها را در تیمارهای مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد. هم چنین بیان نسبی ژن‌های استروئید سازی را در سلول‌های کومولوس به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. اما راندآپ تأثیر قابل ملاحظه‌ای در میزان متیلاسیون DNA پروموتر ژن StAR نداشت. بنابراین می‌توان احتمال داد که تأثیر علف‌کش راندآپ بر کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی، از طریق دیگر مکانیسم‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن باشد.

منابع

1. Andersen, H.R., I.M. Schmidt, P. Grandjean, T.K. Jensen, E. Budtz-Jørgensen, M.B. Kjaerstad, J. Baelum, J.B. Nielsen, N.E. Skakkebaek and K.M. Main. 2008. ImPaired reProductive develoPment in sons of women occuPationally exPosed to Pesticides during Pregnancy. Environmental Health PersPective, 116(4): 566-672.
2. Auger, J., J.M. Kunstmann, F. Czyglik and P. Jouannet. 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the Past 20 years. The New England Journal of Medicine, 332: 281-285.
3. Baccarelli, A. and V. Bollati. 2009. EPigenetics and environmental chemicals. Current OPinion in Pediatrics, 21: 243-251.
4. Bello, U.M., M.C. Madekurozwa, H.B. Groenewald, T.A. Aire and A. Arukwe. 2014. The effects on steroidogenesis and histoPathology of adult male JaPanese quails (Coturnix coturnix jaPonica) testis following Pre-Pubertal exPosure to di(n-butyl) Phthalate (DBP). ComParative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 166: 24-33
5. Bettegowda, A., O.V. Patel, K.B. Lee, K.E. Park, M. Salem, J. Yao, J.J. Ireland and G.W. Smith. 2008. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers Predictive of oocyte comPetence: functional and diagnostic imPlications. Biology of ReProduction, 79: 301-309.
6. Bretveld, R.W., C.M.G. Thomas, P.T.J. ScheePers, G.A. Zielhuis and N. Roeleveld. 2006. Pesticide exPosure: The hormonal function of the female reProductive system disruPted. ReProductive Biology and Endocrinology, 4: 30.
7. CamPagna, C., M.A. Sirard, P. Ayotte and J.L. Bailey. 2001. ImPaired maturation, fertilization and embryonic develoPment of Porcine oocytes following exPosure to an environmentally relevant organochlorine mixture. Biology of ReProduction, 65: 554-560.
8. Casas, E., E. Bonilla, Y. Ducolomb and M. Betancourt. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaProP-ethyl and insecticides Diazinon and Malathion, on viability and maturation of Porcine oocytes in vitro. Toxicology in Vitro, 24: 224-30.
9. Cetica, P.D., L.N. Pintos, G.C. Dalvit and M.T. Beconi. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitromaturation. International Union of Biochemistry and Molecular BiologyLife, 51: 57-64.
10. Cisneros, F.J. 2002. DNA methylation and male infertility. Frontiers in Bioscience, 9: 1189-200.
11. Furger, C., L. Cronier, C. Poirot and M. Pouchelet. 1996. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gaP junctions. Molecular Human ReProduction, 2: 541-548.
12. Giesy, J.P., S. Dobson and K.R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for RounduP herbicide. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 167: 35-120.
13. Hou, L., X. Zhang, D. Wang and A. Baccarelli. 2011. Environmental chemical exPosures andhuman ePigenetics. International Journal of EPidemiology, 41: 79-105.
14. Hughes, S.F., A.F. Haney and C.L. Hughes. 1990. Use of human cumulus granulosa cells for in vitro screening of reProductive toxicants. ReProductive Toxicology, 4: 11-15.
15. Janssenswillen, C., Z.P. Nagy and A. Van Steirteghem. 1995. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stageoocytes to metaPhase II by Coculture with monolayer Verocells. Human ReProduction, 10: 375-376.
16. Jurewicz, J., W. Hanke and T. Makowiec-Dabrowska. 2008. Low risk of reProductive disorders among female greenhouse workers--safe work conditions or health selection for the light work? Medycyna Pracy, 59(2): 123 -31.
17. Kacevska, M., M. Ivanov, A. Wyss, S. Kasela, L. Milani, A. Rane and M. Ingelman-sundberg. 2012. DNA methylation dynamics in the hePatic CYP3A4 gene Promoter. Biochimie, 94(11): 2338-44.
18. Kamarianos, A., X. Karamanlis, P. Goulas, E. Theodosiadou and A. Smokovitis. 2003. ThePresence of environmental Pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheeP, goats, and Pigs). ReProductive Toxicology, 17: 185-190.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

19. Kim, K.Y., D.S. Kim, S.K. Lee, J.H. Kang, Y.S. Chang, J.R.D.R. Jacobs, M. Lee and D.H. Steffes. 2010. Association of low-dose exPosure to Persistent Organic Pollutants with global DNA hyPomethylation in healthy Koreans. Environmental health PersPectives, 118: 370.
20. Koller, V.J., M. Furhacker, A. Nersesyan, M. Misik, M. Eisenbauer and S. Knasmueller. 2012. Cytotoxic and DNA-damaging ProPerties of glyPhosate and RounduP in human-derived buccal ePithelial cells. Arch Toxicol, 86: 805-813.
21. Nandi, S., P. GuPta, S. Roy, S. Selvaraju and J. Ravindra. 2011. ChlorPyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo develoPment in vitro directly and through cumulus cells. Environmental toxicology, 26: 57-67.
22. OrPhanides, G. and D. Reinberg. 2003. A Unified Theory of Gene ExPression. Cell, 108:439–451.
23. Pocar, P., T.A.L. Brevini, B. Fischer and F. Gandolfi. 2003. The imPact of endocrine disruPtors on oocyte comPetence. ReProduction, 125: 313-325.
24. Romano, R.M., M.A. Romano, M.M. Bernardi and C.A. Oliveira. 2010. PrePubertal exPosure to commercial formulation of the herbicide GlyPhosate alters testosterone levels and testicular morPhology. ReProductive Toxicology, 84: 309-317.
25. Sharara, F.I., D.B. Seifer and J.A. Flaws. 1998. Environmental toxicants and female reProduction. Fertility and Sterility, 70: 613-622.
26. Shutoh, Y., M. Takeda, R. Ohtsuka, A. Haishima, S. Yamaguchi, H. Fujie, Y. Komatsu, K. Maita and T. Harada. 2009. Low dose effects of dichlorodiPhenyltrichloroethane (DDT) on gene transcriPtion and DNA methylation in the hyPothalamus of young male rats: imPlication of hormesis-like effects. The Journal of Toxicological Sciences, 34: 469-482.
27. Stoker, T.E., D.L. Guidici, S.C. Laws and R.L. CooPer. 2002. The effects of atrazine metabolites on Puberty and thyroid function in the male wistar rat. Toxicological Sciences, 67: 198-206.
28. Sun, G.M., G.M. Wu, L. Lai, K. W. Park, R. Cabot, H.T. Cheong, B.N. Day, R.S. Prather and H. Schatten. 2001. Translocation of active mitochondria during Pig oocyte maturation, fertilization and early embryo develoPment in vitro. The jornal of the society for reProduction and fertility, 122: 155-163.
29. Walsh L.P. and D.M. Stocco. 2000. Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory Protein exPression. Biology of ReProcuction, 63: 1024-1033.
30. Welshons, W.V., S.C. Nagel and F.S. Vom Saal. 2006. Large effects from small exPosures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisPhenol A at levels of human exPosure. Endocrinology, 147(6): 56-69.
31. Xing C., S. Chen, Y. Wang, Z. Pan, Y. Zou, S. Sun, Z. Ren and Y. Zhang. 2022. GlyPhosate exPosure deteriorates oocyte meiotic maturation via induction of organelle dysfunctions in Pigs. Animal Science and Biotechnology, 13: 80.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]

Effect of Herbicide RounduP on ExPression of Steroidogenic Genes and DNA Methylation of Promoter site of StAR Gene During in Vitro Maturation of Goat Oocyte

Maedeh Gholami[1], Hamid Deldar[2], Zarbakht Ansari Pirsaraei[3] and Ali Barzegar[3]

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran, (CorresPonding aouthor: hdeldar@sanru.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
Received: 30 July, 2022 AccePted: 30 October, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: In conjunction with the increase in PoPulation and the need to Produce more food, Pesticides have been used to control and eliminate Pests in livestock and agricultural Products. Regrettably, the excessive use of Pesticides causes damage to the environment, Plants, animals, water, and soil. The Present study was conducted to investigate the effect of different concentrations of RounduP herbicide as a widely used and common agricultural Pesticide in in vitro maturation of goat oocytes.

Material and Methods: To PrePare goat oocytes, ovaries were PrePared from a slaughterhouse and transPorted to the laboratory into the flask containing warm saline (30-34oC). Oocyte cumulus comPlexes (COC) were removed from small antral follicles (2-6 mm) with the slicing method and transferred to a maturation medium whit different concentration of RounduP. COC was Placed in a maturation medium for 24 hours and reached metaPhase stage II (nuclear maturation). The exPeriment was examined in a comPletely randomized design with 4 treatments included: control, 187.5 µM, 375 µM, and 750 µM of the rounduP.

Results: This study showed that the addition of different concentrations of the herbicide RounduP significantly decreased the maturation rate of goat oocytes than the control treatment ($P < 0.05$). Also, the addition of different concentrations of RounduP in the goat maturation medium reduced the steroidogenic gene exPression in cumulus cells comPared to the control treatment. However, RounduP did not have a considerable influence on DNA methylation in the Promoter site of the StAR gene.

Conclusion: The efficacy of the treatment with a dose of 187.5 µM of the rounduP in reducing the relative exPression of StAR, CYP11A1 and CYP19 genes was higher than the 375 µM, which could be as a consequence of the fact that hormone disruPters (environmental Pollutants) have strong biological effects in low concentrations, but in high concentrations, they have weak or no biological effects.

Keywords: DNA methylation, Herbicide RounduP, In vitro maturation, Oocyte cumulus comPlex

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1402.14.39.10.1]
[DOI: 10.61186/rap.14.39.94]