

مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
 دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
 دوره‌ی بیست و سوم، شماره‌ی ۲، صفحه‌های ۱۰۱ - ۹۲ (خرداد - تیر ۱۴۰۰)

بیان ژن گیرنده هورمون لوتئینی (LH) در تخمدان مدل موش صحرائی بالغ مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک القاء شده به دنبال مواجهه با آندروژن در دوره پیش از تولد

مهسا نوروززاده^۱، دکتر مرضیه صالحی جهرمی^۲، هانیه غلامی^۳، دکتر فهیمه رضائی تهرانی^۱

۱) مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۲) گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز دیابت و غدد درون‌ریز، دانشکده‌ی تحقیقات پزشکی، دانشگاه تولید، اوهایو، آمریکا، ۳) مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۴، مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، دکتر فهیمه رضائی تهرانی؛
 e-mail: ramezani@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: بر اساس شواهد موجود، مواجهه جنین ماده با آندروژن‌ها در دوره پیش از تولد، با متاثر ساختن بیان برخی ژن‌ها، می‌تواند موجب بروز سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) در بزرگسالی شود. از سوی دیگر، تغییرات در سطوح هورمون لوتئینی (LH) و گیرنده آن با خطر ابتلا به اختلالات تولیدمثلی، از جمله PCOS، همراه می‌شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی میزان بیان ژن گیرنده LH در تخمدان موش صحرائی مدل PCOS، القاء شده توسط مواجهه با آندروژن در دوره پیش از تولد، می‌باشد. مواد و روش‌ها: در موش‌های صحرائی بالغ مبتلا به PCOS و شاهد (۸ سر حیوان در هر گروه)، تعیین فازهای مختلف چرخه‌ی جنسی (چرخه‌ی استروس) با استفاده از اسمیرهای واژن، و اندازه‌گیری فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی (AGD) توسط ورنیه، صورت گرفت. سلول‌های گرانولوزای تخمدانی جداسازی شدند و RNA سلولی استخراج گردید. میزان بیان ژن گیرنده LH در این سلول‌ها به روش Real-time polymerase chain reaction تعیین شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism تجزیه و تحلیل شدند. یافته‌ها: چرخه‌های جنسی بی‌نظم و طولانی‌تر، افزایش AGD (۱۷/۳۲±۰/۳) در مقابل ۱۱/۷۳±۰/۲۶ میلی‌متر (P=۰/۰۰۰۱)) و کاهش در بیان ژن گیرنده LH (۰/۴۲±۰/۱۲) در مقابل ۰/۸۸±۰/۱۳ (P=۰/۰۲))، در مدل موش صحرائی بالغ مبتلا به PCOS، در مقایسه با حیوان‌های کنترل مشاهده شد. نتیجه‌گیری: کاهش در بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزای تخمدان، ممکن است یکی از مکانیسم‌های درگیر در پاتوفیزیولوژی PCOS به دنبال مواجهه جنین ماده با آندروژن‌ها در دوره پیش از تولد باشد.

واژگان کلیدی: آندروژن، زندگی جنینی، گیرنده LH، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، موش صحرائی

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۰/۰۹/۸ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS: Polycystic ovary syndrome) یکی از شایع‌ترین اختلالات اندوکرینی در زنان در سنین تولیدمثلی می‌باشد و شیوع آن در جهان ۲۰-۴ درصد می‌باشد.^۱ تشخیص PCOS با وجود حداقل دو ویژگی از سه ویژگی شامل، سطوح بالای آندروژن‌ها، اختلال در

تخمک‌گذاری، و وجود کیست‌های تخمدانی صورت می‌گیرد.^۲ شایع‌ترین علت ناباروری‌های ناشی از عدم تخمک‌گذاری، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌باشد. برخی از اختلال‌های متابولیک همراه با این سندرم عبارتند از، مقاومت به انسولین، اختلال در سطوح چربی خون، دیابت نوع ۲، چاقی و به دنبال آن افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی.^۲

است،^۲ مطالعه جنبه‌های ژنتیکی آن ممکن و در مورد انسان، قابل استناد به نظر می‌رسد. ما در مطالعات قبلی موفق شدیم با استفاده از مواجهه‌سازی جنین موش‌های صحرایی با مقادیر اضافی از آندروژن، مدلی (القائه شده پیش از تولد) برای PCOS تولید نماییم که به نمونه‌های انسانی از این سندرم شباهت زیادی دارد.^{۱۱} در این مدل حیوانی از PCOS، تخمدان پلی کیستیک، اختلال در چرخه‌ی جنسی و کاهش تخمک‌گذاری، افزایش سطوح LH و تستوسترون در سرم خون، و اختلالات متابولیسمی از جمله مقاومت به انسولین در بزرگسالی زاده‌های ماده مشاهده شد.

هدف اصلی ما از مطالعه حاضر، مقایسه بیان ژن گیرنده هورمون LH در تخمدان موش‌های صحرایی سالم و مدل مبتلا به PCOS برای بررسی اثر احتمالی آندروژن مازاد جنینی بر این ژن و فرایند فولیکولوژن در بزرگسالی بوده است. تا آنجا که ما می‌دانیم، این اولین مطالعه در مورد تعیین میزان بیان ژن گیرنده LH در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS القاء شده به دنبال مواجهه با یک دوز از آندروژن، در دوره پیش از تولد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تأییدیه اخلاق

مراقبت و نگهداری از حیوان‌ها در این مطالعه مطابق با اصول و استانداردهای نگهداری حیوان‌های آزمایشگاهی صورت گرفت. انجام این طرح تحقیقاتی توسط کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده‌ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تأیید قرار گرفت و تمام اصول اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی رعایت شدند. (کد کمیته اخلاق: ۱۳۹۸/۰۲۳/IR.SBMU.ENDOCRINE.REC)

حیوان‌ها و شرایط نگهداری

ده سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار (در محدوده وزنی ۱۷۰-۱۸۰ گرم و محدوده سنی ۸۵-۹۵ روز) از مرکز نگهداری و پرورش حیوان‌های پژوهشکده‌ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (تهران، ایران) تهیه شدند.

هر یک جفت موش صحرایی نر و ماده به صورت جداگانه در یک قفس پلی اتیلن به مدت یک شبانه روز در شرایط استاندارد و مناسب (چرخه‌ی نوری، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای کنترل شده 22 ± 2)

علاوه بر عوامل ژنتیک، مواجهه با سطوح بالا از آندروژن‌ها در طی دوره جنینی؛ با ایجاد تغییرات اپی ژنتیک، یک عامل موثر در بروز PCOS در دوره‌های بعدی زندگی می‌باشد. محیط داخل رحمی هیپراندرژنیک، بیان ژن‌های مرتبط با ساخته شدن استروئیدهای تخمدانی و ترشح گنادوتروپین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و موجب افزایش خطر وقوع بیماری‌های همراه با اختلالات هورمونی، از جمله PCOS، در مراحل بعدی زندگی جنین در حال نمو می‌شود.^۲ در طول سال‌های گذشته، برخی از ژن‌ها که در متابولیسم آندروژن و فولیکولوژن دخیل هستند و به نظر می‌رسد که در تکامل PCOS نقش دارند، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، با این حال هنوز بسیاری از ژن‌های درگیر در بروز این سندرم ناشناخته مانده و اتفاق نظری در این زمینه وجود ندارد.

هورمون لوتهینی (LH) نقش مهمی را در فولیکولوژن، تخمک‌گذاری و تولید آندروژن‌ها بازی می‌کند.^۴ تغییرات در سطوح LH و گیرنده آن، با خطر ابتلا به برخی از اختلالات تولیدمثلی از جمله PCOS و اختلال در تخمک‌گذاری همراه می‌شود.^۵ در زنان مبتلا به PCOS و مدل‌های حیوانی بیماری، افزایش در سطوح LH گزارش شده است. اگرچه دلیل این افزایش هنوز ناشناخته است، اما پیشنهاد می‌شود که این پدیده می‌تواند به دلیل تأثیر مقادیر مازاد آندروژن بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان و ایجاد یک حلقه‌ی بازخورد^۶ منفی ناقص بر ترشح LH باشد.^۷ بنابراین، نقش ژن LH و ژن گیرنده آن در تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان و عملکرد صحیح تخمدان مطرح بوده و از ژن‌های نامزد برای دخالت در فرآیند پاتولوژیک PCOS می‌باشند.

علی‌رغم شیوع بالای PCOS و پیامدهای منفی آن، پاتوفیزیولوژی این سندرم و ساز و کار بیماری‌زایی آن بطور دقیق مشخص نشده است.^۸ با توجه به وجود برخی محدودیت‌های اخلاقی و عدم امکان انجام برخی آزمایش‌ها در انسان، مدل‌های حیوانی مناسب از این سندرم، می‌توانند منابع مهمی برای مطالعه هر چه بیشتر و شناسایی علت یا علل بروز این سندرم باشند. با توجه به دسترس بودن مدل‌های حیوانی این بیماری، به ویژه مدلی از سندرم که در دوره پیش از تولد (prenatal) به دنبال مواجهه با هورمون‌های استروئیدی خاص (آندروژن‌ها) القاء شده

پس از اتمام دوره شیرخوارگی، زاده‌های ماده حاصل از هر گروه، به طور تصادفی جداسازی و تقسیم‌بندی شدند و در گروه‌های چهار تایی در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی قرار گرفتند.

زاده‌های ماده‌ای که در دوران جنینی از طرف مادر در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند، به عنوان گروه آزمایشی (مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (تعداد= ۸ سر)) و زاده‌های ماده‌ای که در دوران جنینی مواجهه با تستوسترون نداشته‌اند، به عنوان گروه شاهد (تعداد= ۸ سر)، در نظر گرفته شدند و در ۸۰ تا ۹۰ روزگی از سن (بالغ)، از نظر نظم در چرخه‌ی جنسی (چرخه‌ی استروس^۱) و بین ۱۰۰ تا ۱۱۰ روزگی از سن، از نظر فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی (AGD: Anogenital Distance) و میزان بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزای تخمدانی مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفتند (شکل ۱).

درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی (۵۵-۴۵ درصد) نگه‌داری شدند. مشاهده پلاگ واژنی (واژینال پلاگ) پس از جفت‌گیری، به عنوان اولین روز حاملگی در نظر گرفته شد. موش‌های صحرایی باردار به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند.

مواجهه با آندروژن به منظور تولید مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک
همان‌طور که در مطالعات پیشین گزارش شده است، برای ایجاد مدل^{۹۱۰} در یک گروه (تعداد حیوان باردار= ۵ سر)، به هر حیوان باردار در روز ۲۰ بارداری ۵ میلی‌گرم تستوسترون آزاد (T1۵۰۰، سیگما، آلمان) که در ۵۰۰ میکرولیتر روغن کنجد (S۳۵۴۷، سیگما، آلمان) و بنزویل بنزوات (B۶۶۳۰، سیگما، آلمان) به نسبت ۴ به ۱ به عنوان حلال حل شده بود، به صورت زیرجلدی تزریق شد، و در گروه دیگر (تعداد حیوان باردار= ۵ سر)، به هر حیوان باردار، فقط ۵۰۰ میکرولیتر از حلال تزریق شد.

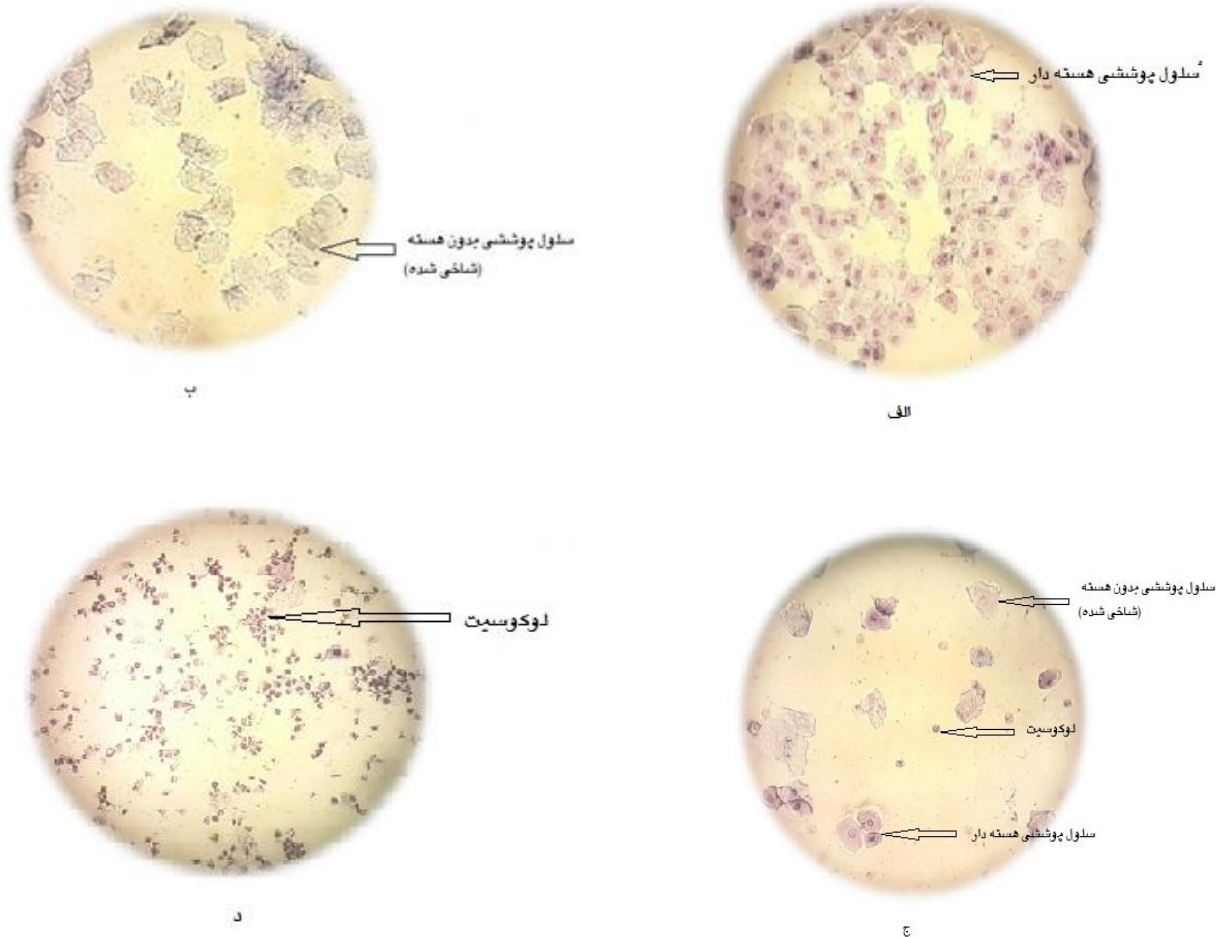


شکل ۱- گروه‌بندی حیوان‌ها

بررسی فازهای چرخه‌ی جنسی

به منظور بررسی نظم در چرخه‌ی جنسی و مقایسه آن بین دو گروه آزمایشی و کنترل، فازهای مختلف چرخه‌ی استروس در حیوان‌های هر دو گروه به طور روزانه (۱۰ روز متوالی) مشخص شدند. به این صورت که در ابتدا به منظور رقیق‌سازی ترشحات واژن، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر در واژن هر موش صحرایی تخلیه شد و سپس به آرامی و با حداقل تماس با جدار واژن، ۵۰ میکرولیتر از ترشحات واژن هر موش صحرایی برداشته شد و بر روی یک لام شیشه‌ای تمیز کشیده شد و در معرض هوا خشک گردید. لام‌ها با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۱۰۰) مورد بررسی قرار

گرفتند. طول مدت چرخه‌ی جنسی در حالت طبیعی در موش‌های صحرایی ماده ۵-۴ روز می‌باشد. فازهای مختلف چرخه‌ی جنسی بر اساس فراوان‌ترین نوع سلول، شامل سلول‌های پوششی هسته‌دار، سلول‌های پوششی بدون هسته شاخی شده و لوکوسیت‌ها در اسمیر واژن، مشخص می‌شوند. در فاز پرواستروس، فراوان‌ترین نوع سلول، سلول پوششی هسته‌دار، در فاز استروس، فراوان‌ترین نوع سلول، سلول پوششی بدون هسته شاخی شده، در فاز مت استروس، ترکیبی از سه نوع سلول (پوششی هسته‌دار، پوششی بدون هسته شاخی شده و لوکوسیت‌ها) و در فاز دی استروس، فراوان‌ترین نوع سلول، لوکوسیت‌ها می‌باشند. (شکل ۲).



شکل ۲- فازهای مختلف چرخه‌ی جنسی (چرخه‌ی استروس). فازهای مختلف چرخه‌ی جنسی بر اساس فراوان‌ترین نوع سلول، شامل سلول‌های پوششی هسته‌دار، سلول‌های پوششی بدون هسته شاخی شده و لوکوسیت‌ها در اسمیر واژن، مشخص می‌شوند. (الف) فاز پرواستروس: فراوان‌ترین نوع سلول، سلول پوششی هسته‌دار، (ب) فاز استروس: فراوان‌ترین نوع سلول، سلول پوششی بدون هسته شاخی شده، (ج) فاز مت استروس: ترکیبی از سه نوع سلول (پوششی هسته‌دار، پوششی بدون هسته شاخی شده و لوکوسیت‌ها)، (د) فاز دی استروس، فراوان‌ترین نوع سلول، لوکوسیت‌ها

اندازه‌گیری AGD

در فواز دی استروس از چرخه‌ی جنسی، وزن بدن موش‌های صحرایی بالغ در هر دو گروه آزمایشی (مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS) و کنترل، اندازه‌گیری شد و محدوده وزن بدنشان بین ۱۹۰-۱۸۰ گرم بود. حیوان‌ها با استفاده از تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (۶۰ میلی‌گرم به ازاء ۱ کیلوگرم وزن بدن) (P3۷۱۱، ۵ گرم، سیگما، آمریکا) بیهوش شدند، پس از بیهوشی کامل حیوان، فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی (AGD) (فاصله بین لبه قدامی مقعد تا پایه برجستگی تناسلی) با استفاده از ورنیه اندازه‌گیری شد.

جداسازی سلول‌های گرانولوزای تخمدان

پس از اندازه‌گیری AGD، شکم حیوان باز شده، هر دو تخمدان با استفاده از پنس استریل از بدن حیوان خارج شدند و سلول‌های گرانولوزای تخمدانی، جداسازی و ذخیره شدند. به طور خلاصه، تخمدان‌ها بلافاصله پس از استخراج از بدن حیوان در ظرف‌های پتری حاوی محلول بافر فسفات سرد با pH=۷/۴، که بر روی یخ خشک قرار داده شده بودند، انتقال داده شدند. پس از برداشتن بافت چربی اطراف تخمدان‌ها، تخمدان‌ها به ظرف پتری حاوی محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ منتقل شدند و در زیر لوپ، فولیکول‌ها یک به یک با استفاده از پنس باریک جداسازی و برداشته شدند. فولیکول‌های جداسازی شده با سر سوزن نازک انسولین پاره شده و تحت فشار قرار گرفتند و محتویات کامل درون آن‌ها؛ که شامل مایع فولیکولی، سلول‌های گرانولوزا و تخمک است، از فولیکول‌ها آزاد و خارج گردید. تخمک‌ها به کمک پیپت دهانی از سلول‌های گرانولوزا جدا شدند. سوسپانسیون سلولی به فالكون عاری از RNase منتقل شد و برای جداسازی سلول‌های گرانولوزا از مایع فولیکولی در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با دور چرخشی بالا (بیش از ۱۰۰۰۰ برای ۱ دقیقه)، قرار گرفت. مایع رویی به آهستگی جدا شده و دور ریخته شد. لایه سفید رنگ ته‌نشین شده در قسمت انتهایی فالكون، حاوی سلول‌های گرانولوزا بود. برای جلوگیری از انهدام RNA، ماده ته‌نشین شده به میکروتیوب‌های عاری از آنزیم‌های RN-DNase منتقل و به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفت. میکروتیوب‌های حاوی سلول‌های گرانولوزا تا زمان انجام آزمایش‌های لازم در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به علت عدم دسترسی به امکانات فلوسایتومتری، روش خاصی برای سنجش مقدار یا تعداد سلول‌های گرانولوزا استفاده نشد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و سنجش بیان ژن توسط Real-time polymerase chain reaction

از کل سلول‌های گرانولوزای جداسازی شده جهت استخراج RNA استفاده گردید. هنگام ساخت cDNA مقدار RNAی استفاده شده برای نمونه‌های مختلف همسان‌سازی گردید (بر اساس غلظت و خلوص RNA) تا در انتها مقدار cDNA همه نمونه‌ها یکسان باشد.

استخراج RNA از سلول‌های گرانولوزای بافت تخمدانی با استفاده از پروتکل ترایزول انجام شد.^{۱۰} با استفاده از کیت (Qiagen, USA) ساخت cDNA انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده و cDNA ساخته شده با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری نانودراپ ۱۰۰۰ اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری میزان بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزا، Real-time PCR با استفاده از رنگ سایبر گرین^۱ و پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) انجام شد.

واکنش‌ها در حجم‌های ۱۵ میکرولیتری حاوی ۷/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR (فرمنتاز، آلمان)، ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر جلورونده و عقب رونده، ۵/۳ میکرولیتر آب عاری از RNase، و ۱ میکرولیتر از cDNA انجام شدند. PCR برای نمونه‌های دو نسخه‌ای با استفاده از دستگاه Real-time PCR (کوربت^{۱۱}، سیدنی، استرالیا) در یک برنامه ۴۰ چرخه‌ای با واسرشت اولیه (۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، به دنبال آن یک برنامه تقویتی دو مرحله‌ای (۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۵ ثانیه در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد)، در هر چرخه انجام شد. مقدار نسبی mRNA در هر نمونه بر اساس چرخه‌ی آستانه آن (Ct) در مقایسه با چرخه‌ی آستانه بتا-اکتین، به عنوان ژن مرجع، محاسبه شد.

کارایی پرایمر طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$Efficiency (\%) = \left(10^{\frac{-1}{Slope}} - 1 \right) \times 100$$

i- Cyber Green

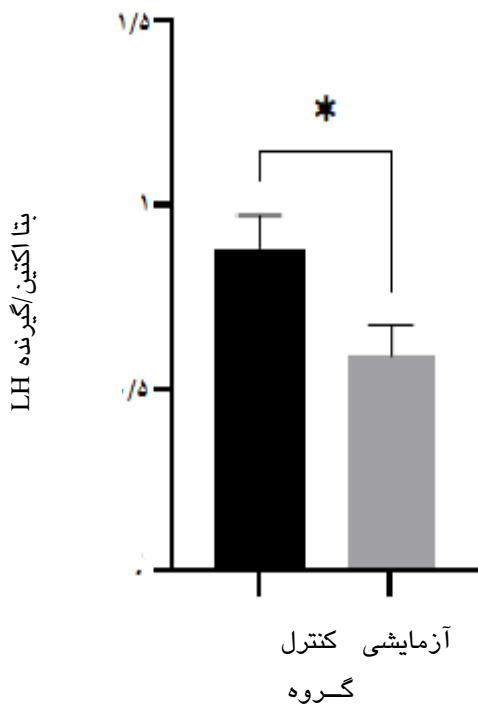
ii -Corbet

کارایی پرایمرهای ژن گیرنده LH در این مطالعه ۹۴٪ و کارایی ژن بتا اکتین برابر ۹۶٪ محاسبه شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده مورد استفاده در مطالعه

اندازه محصول	Accession No.	Tm	توالی پرایمر	جهت	ژن
۱۲۹ bp	NM_012978.2	۵۸/۹۷	TCTCACCTATCTCCCTGTCAAAG	Forward	گیرنده LH
		۵۸/۳۱	AGGAGGTTGTCAAAGGCATTAG	Reverse	
۷۳ bp	NM_031144.3	۵۹/۰۶	CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	Forward	بتا اکتین
		۶۲/۲۴	CACAGCCTGGATGGCTACGT	Reverse	

معنی داری را به لحاظ آماری نشان داد (شکل ۳). میزان بیان ژن گیرنده LH در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، 0.42 ± 0.12 و در موش‌های صحرایی گروه کنترل 0.88 ± 0.13 بوده است ($P=0.02$) (شکل ۳).



شکل ۳- سطوح بیان mRNA گیرنده LH. میانگین \pm خطای استاندارد میانگین، *t*-student test. تعداد حیوان = ۸ سر در هر گروه، گروه آزمایشی: مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک $P < 0.05$

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزای تخمدان در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، القاء شده به دنبال مواجهه با تک دوز آندروژن در دوره پیش از تولد، در مقایسه با حیوان‌های

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی نرمال بودن توزیع متغیرهای پیوسته از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (mean \pm SEM) گزارش شدند. برای مقایسه نتایج بین دو گروه از آزمون *t*-student استفاده شد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نسخه ۶ نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد.

یافته‌ها

چرخه‌ی جنسی

بررسی روزانه اسمیرهای تهیه شده از ترشحات واژن در طول ۱۰ روز متوالی نشان داد که مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، چرخه‌ی جنسی طولانی‌تر و نامنظمی در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل دارند. به این معنی که مدت زمان هر فاز تغییر کرده بود و بی‌نظمی به این صورت بود که توالی و نظم که در فازهای چرخه‌ی جنسی موش‌های صحرایی گروه کنترل بود در موش‌های صحرایی مدل PCOS مشاهده نشد و چند روز در فازی که حاوی ترکیبی از سلول‌های پوششی هسته‌دار و پوششی بدون هسته یعنی ترکیبی از فازهای پرواستروس و استروس بود متوقف شده بود.

اندازه‌گیری AGD

AGD در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته بود ($17/32 \pm 0/3$ در مقابل $11/73 \pm 0/26$ میلی‌متر) ($P=0/0001$).

بیان ژن گیرنده LH

میزان بیان ژن گیرنده LH در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با حیوان‌های گروه کنترل کاهش

گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است. به علاوه، اختلال در چرخه‌ی جنسی و افزایش AGD در این مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با حیوان‌های گروه کنترل مشاهده شد.

هورمون لوتئینی یک گلیکوپروتئین ۲۹ کیلو دالتونی است متشکل از یک زنجیره آلفا و یک زنجیره بتا. این هورمون که اولین تنظیم‌کننده مسیر استروئیدوژنز (تولید استروئید) در فولیکول‌های تخمدانی محسوب می‌شود، در هیپوفیز قدامی تولید و ترشح می‌شود؛ با برهمکنش و اتصال به گیرنده‌های اختصاصی اش بر روی سلول‌های تکا و گرانولوزا و فعال‌سازی مسیر پیام‌رسان وابسته به cyclic cAMP (Adenosine Monophosphate) بر روی سلول‌های بافت هدف، اثرات بیولوژیک خود را؛ که شامل افزایش در بیان آنزیم‌های کلیدی استروئیدوژنیک و تولید هورمون‌های جنسی، تحریک رشد فولیکولی، بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری در جنس ماده می‌باشد را، اعمال می‌کند.^{۱۹-۱۶}

سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکا با همکاری هم، تحت تأثیر LH و هورمون تحریک‌کننده فولیکول (FSH)، استروژن را سنتز می‌کنند. در این فرآیند، ابتدا سلول‌های تکا آندروژن‌ها را سنتز کرده و از طریق غشای پایه آن‌ها را به سلول‌های گرانولوزای تخمدانی منتقل می‌کنند و پس از آن آندروژن‌ها از طریق عمل کاتالیزوری آنزیم آروماتاز به استروژن تبدیل می‌شوند. وجود مقدار قابل توجهی از گیرنده LH بر روی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های قبل از تخمک‌گذاری هم‌چنین موج LH در میانه چرخه‌ی جنسی منجر به پارگی فولیکول و تخمک‌گذاری می‌شود.

تا به امروز، ارتباط بین مسیر پیام‌دهی LH و PCOS به درستی روشن نشده است. با این حال اعتقاد بر این است که پیام‌دهی غیرطبیعی LH، به علت جهش و تغییرات در ژن LH و یا ژن گیرنده آن که منجر به تغییر در ساختار و عملکرد LH و گیرنده‌اش می‌شود، نقش مهمی در افزایش تولید آندروژن‌ها در تخمدان‌ها و اختلال در تخمک‌گذاری مشابه آن چه که در PCOS رخ می‌دهد بازی می‌کند.^{۲۰،۲۱} بنابراین، فولیکولوژنز تغییر یافته و ناهنجاری‌های تولیدمثلی همراه شده با این سندرم نشان می‌دهد که تغییرات ژن‌های دخیل در فولیکولوژنز، به عنوان مثال، ژن LH و ژن مربوط به گیرنده آن ممکن است به عنوان یکی از علل بروز این سندرم باشد. ما نیز در مطالعه حاضر، کاهش بیان ژن گیرنده LH را در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در

مقایسه با حیوان‌های گروه کنترل مشاهده کردیم.

پاسخ زودرس سلول‌های گرانولوزا به LH، که باعث لوتئینه شدن سلول‌های گرانولوزا می‌شود، می‌تواند ناشی از کاهش بیان گیرنده LH بر روی سلول‌های گرانولوزا باشد. کاهش بیان گیرنده LH، حتی زمانی که ترشح LH زیاد باشد، می‌تواند باعث عدم تخمک‌گذاری شود. از طرف دیگر، عدم تخمک‌گذاری منجر به عدم رشد جسم زرد و کاهش تولید پروژسترون می‌شود. این فرایند در ادامه منجر به نارسایی فاز لوتئال و سکون جسم زرد می‌شود؛ که در این شرایط نمی‌تواند نیازهای سلول تخم را قبل از این که جفت از نظر عملکردی فعال شود را تأمین کند. نتیجه این بی‌نظمی‌ها و ناکارآمدی‌ها؛ افزایش خطر سقط جنین است. بنابراین، میزان بالاتر سقط جنین در زنان مبتلا به PCOS را می‌توان با بیان کمتر گیرنده LH بر روی سلول‌های گرانولوزا تخمدان این بیماران توضیح داد.^{۲۲-۲۴}

اگرچه هنوز سبب‌شناسی و سازوکار بیماری‌زایی PCOS به طور دقیق روشن نشده است، با این حال بسیاری از مطالعات نقش ژن‌ها؛ از جمله ژن‌های درگیر در مسیر تولید هورمون‌های استروئیدی و گنادوتروپین‌ها را، در تکامل این سندرم پیشنهاد کرده‌اند.^{۲۵} با توجه به نقش LH و گیرنده آن در تنظیم و عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان و سیستم تولیدمثلی جنس ماده، شاید یکی از مکانیسم‌های درگیر در بروز PCOS و اختلالات همراه با آن از جمله اختلال در تخمک‌گذاری، تشکیل فولیکول‌های کیستیک در تخمدان و تغییرات در سطوح هورمون‌های جنسی از جمله آندروژن‌ها، استروژن‌ها و پروژسترون به دنبال مواجهه پیش از تولد با آندروژن‌ها، کاهش بیان ژن گیرنده LH باشد، اگرچه این یافته نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

در مطالعات قبلی که بر روی زنان مبتلا به PCOS انجام شده است، همراهی بین پلی‌مورفیسم‌های ژن گیرنده LH و بروز بیماری مشاهده شده است.^{۲۶} در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های تکا و گرانولوزای تخمدان زنان مبتلا به PCOS در مقایسه با زنان نرمال افزایش می‌یابد.^{۲۶} هم‌چنین گزارش شده است که میکروهنروژنتیکی و تنوع ژنتیکی زیر واحد بتای LH و گیرنده LH ممکن است بر روی فعالیت زیستی LH و گیرنده‌اش تاثیر بگذارد و باعث بروز PCOS شود.^{۲۷} در یک مطالعه انجام شده بر روی یک مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، اثرات درمانی Genistein بر روی سطوح هورمونی و بیان گیرنده

رحمی در طول زندگی قبل از تولد ممکن است نقش مهمی در تکامل و بروز PCOS در دوره‌های بعدی زندگی داشته باشد.^{۴۰} در مطالعه حاضر، به منظور حصول اطمینان از مواجهه حیوان‌های گروه آزمایشی با آندروژن در دوره پیش از تولد، که خود عاملی برای تکامل PCOS در دوره‌های بعدی زندگی می‌باشد، AGD به عنوان یک عامل مهم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

مدل‌های حیوانی ایجاد شده برای PCOS، که به دنبال مواجهه با آندروژن‌ها در کم‌ترین زمان و با مقادیر کم‌تر در دوره پیش از تولد القاء شده و اختلالات اندوکرینی، تخمدانی و متابولیکی شبیه به علائم PCOS در زنان را نشان می‌دهند، می‌توانند مدل‌های مناسبی برای مطالعه هر چه بیشتر برای دریافت سازو کارهای بیماری‌زایی PCOS باشند. بنابراین یکی از نقاط قوت مطالعه ما می‌تواند شیوه القاء مدل و بروز علائم مشابه به زنان مبتلا به این سندرم در این حیوانات باشد. این مدل موش صحرایی شاید بتواند مدل مناسبی برای مطالعه در زمینه‌ی ایجاد روش‌های پیشگیرانه یا درمانی مناسب برای این سندرم باشد. یکی از نقاط ضعف مطالعه ما عدم بررسی میزان بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های تکا و بینابینی بافت تخمدان در این مدل حیوانی از PCOS می‌باشد.

نتیجه‌گیری

کاهش در بیان ژن گیرنده LH در سلول‌های گرانولوزای تخمدان، ممکن است یکی از مکانیسم‌های درگیر در پاتوفیزیولوژی PCOS به دنبال مواجهه جنین ماده با آندروژن‌ها در دوره پیش از تولد باشد. شاید بتوان با استفاده از این مدل حیوانی از PCOS، به شناخت هر چه بیشتر مسیرهای منحرف شده منتهی به سندرم، درک بهتر علل و پاتوفیزیولوژی این سندرم، هم‌چنین پیشگیری، درمان و مدیریت بهتر این بیماری دست پیدا کرد.

سپاسگزاری: مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد کمیته اخلاق ۱۳۹۸/۰۲۳ IR.SBMU.ENDOCRINE.REC. تأیید شده است. بدین‌وسیله از حمایت مالی و فراهم‌سازی امکانات و تجهیزات لازم آزمایشگاهی توسط پژوهشکده و دانشگاه مذکور تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در رابطه با این مطالعه، انتشار مقاله و اسامی نویسندگان وجود ندارد.

LH و FSH بعد از سن بلوغ، مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده است که سطح پروتئین و بیان پروتئین گیرنده LH بعد از تیمار با Genistein افزایش پیدا کرده است.^{۲۸}

همان‌طور که در قسمت بالا توضیح داده شد، هر گونه اختلال در گیرنده LH خود می‌تواند عاملی برای اختلال در فولیکولوژنز باشد. توقف رشد فولیکولی در تخمدان‌ها؛ منجر به کاهش یا عدم تخمک‌گذاری می‌گردد. در این پژوهش، چرخه‌ی جنسی حیوان‌های مدل مبتلا به PCOS و حیوانات شاهد را، به منظور بررسی همراهی احتمالی اختلال در تخمک‌گذاری و چرخه‌ی جنسی با تغییرات در بیان ژن گیرنده LH مورد بررسی و مقایسه قرار دادیم. نتایج بدست آمده نشان داد که چرخه‌ی استروس در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، القاء شده به دنبال مواجهه با آندروژن در دوره پیش از تولد، دچار اختلال شده بود، که این اختلال بی‌نظمی در چرخه‌ی جنسی خود می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در تخمک‌گذاری باشد. این یافته مشابه یافته‌ها در مطالعات قبلی بوده است،^{۲۹،۳۰} همان‌طور که در زنان مبتلا به PCOS و نمونه‌های حیوانی از PCOS، اختلال در چرخه‌ی جنسی گزارش شده است.^{۲۳،۳۱}

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که AGD یک نشانگر زیستی آنتروپومتریک محیط آندروژنیک در طی توسعه سیستم تولیدمثلی و مواجهه پیش از تولد با عوامل مختل‌کننده اندوکرینی می‌باشد.^{۳۲،۳۳} بر اساس شواهد موجود که در مطالعات انسانی و حیوانی گزارش شده است، AGD یک عامل تعیین‌کننده‌ی زیستی حساس به عملکرد آندروژن قبل از تولد و بازتابی از سلامت باروری و تولیدمثلی می‌باشد.^{۳۴-۳۶} مطالعات انجام شده بر حیوان‌های ماده نشان داده‌اند که مواجهه پیش از تولد با آندروژن باعث مردانه شدن سیستم تولیدمثلی خارجی از جمله AGD می‌شود.^{۳۰،۳۷} در مطالعه حاضر شاهد افزایش AGD در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS بودیم. به علاوه، در دخترانی که هیپرپلازی مادرزادی آدرنال داشته‌اند، که در دوره پیش از تولدشان با آندروژن زیادی مواجه شده‌اند، افزایش در AGD مشاهده شده است.^{۳۸} به همین ترتیب، دختران تازه متولد شده از زنان مبتلا به PCOS نسبت به دختران زنان بدون PCOS به طور قابل توجهی AGD طولانی‌تری داشته‌اند.^{۳۹} علاوه بر این، یک ارتباط قوی بین AGD و وجود PCOS گزارش شده است که نشان می‌دهد محیط هورمونی داخل

References

- Deswal R, Narwal V, Dang A, Pundir CS. The prevalence of polycystic ovary syndrome: a brief systematic review. *J Hum Reprod Sci* 2020; 13: 261-71.
- Bulsara JP, Patel P, Soni A, Acharya S. A review on brief insight into Polycystic Ovarian syndrome. *Endocr Metab Sci* 2021; 100085.
- Filippou P, Homburg R. Is foetal hyperexposure to androgens a cause of PCOS? *Hum Reprod Update* 2017; 23: 421-32.
- Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliclelogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril* 1999; 71: 405-14.
- Deswal R, Nanda S, Dang AS. Association of Luteinizing hormone and LH receptor gene polymorphism with susceptibility of Polycystic ovary syndrome. *Sys Biol Reprod Med* 2019; 65: 400-08.
- Diamanti-Kandaraki E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 631-43.
- Mahajan DK. Steroidogenesis in human polycystic ovary. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 1988; 17: 751-69.
- Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14: 270-84.
- Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol* 2014; 99: 792-801.
- Noroozadeh M, Tehrani FR, Sedaghat K, Godini A, Azizi F. The impact of prenatal exposure to a single dose of testosterone on insulin resistance, glucose tolerance and lipid profile of female rat's offspring in adulthood. *J Endocrinol Invest* 2015; 38: 489-95.
- Marcondes F, Bianchi F, Tanno A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62: 609-14.
- Harlow CR, Bradshaw AC, Rae MT, Shearer KD, Hillier SG. Oestrogen formation and connective tissue growth factor expression in rat granulosa cells. *J Endocrinol* 2007; 192: 41-52.
- Salehi Jahromi M, Ramezani Tehrani F, Hill JW, Noroozadeh M, Zarkesh M, Ghasemi A, et al. Alteration in follistatin gene expression detected in prenatally androgenized rats. *Gynecol Endocrinol* 2017; 33: 433-37.
- Salehi Jahromi M, Hill JW, Ramezani Tehrani F, Zadeh-Vakili A. Hypomethylation of specific CpG sites in the promoter region of steroidogenic genes (GATA6 and StAR) in prenatally androgenized rats. *Life Sci* 2018; 207: 105-09.
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 2010: pdb. prot5439.
- Jiang X, Dias JA, He X. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 424-51.
- Young KA, Chaffin CL, Molskness TA, Stouffer RL. Controlled ovulation of the dominant follicle: a critical role for LH in the late follicular phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 2003; 18: 2257-63.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994; 15: 725-51.
- Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 924-36.
- Balen AH. Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1993; 8: 123-28.
- Huhtaniemi I, Themmen A. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 2005; 26: 207-17.
- Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. *Hum Reprod* 2000; 15: 612-15.
- Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinizing hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet* 1990; 336: 1141-44.
- Benmachiche A, Benbouhedja S, Zoghmar A, Humaidan P. Low LH level on the day of GnRH agonist trigger is associated with reduced ongoing pregnancy and live birth rates and increased early miscarriage rates following IVF/ICSI treatment and fresh embryo transfer. *Front Endocrinol* 2019; 10: 639.
- Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic basis of polycystic ovary syndrome (PCOS): current perspectives. *Appl Clin Genet* 2019; 12: 249.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1318-23.
- Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC, Taylor AE, Clayton RN, Rajkova M, et al. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1711-15.
- Zhang T, Chi XX. Estrogenic properties of genistein acting on FSHR and LHR in rats with PCOS. *Pol J Vet Sci* 2019; 22: 83-90.
- Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2007; 148: 3781-91.
- Wu XY, Li ZL, Wu CY, Li YM, Lin H, Wang S-H, et al. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J* 2010; 57: 201-9.
- Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, Campbell RE, Benrick A, Giacobini P, et al. Animal models to understand the etiology and pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2020; 41: 538-76.
- Dean A, Sharpe RM. Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2230-38.
- Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: a detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod* 2013; 28: 2343-49.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci* 2001; 62: 236-49.
- Wolf CJ, LeBlanc GA, Gray Jr LE. Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicol Sci* 2004; 78: 135-43.

36. Thankamony A, Pasterski V, Ong KK, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance as a marker of androgen exposure in humans. *Andrology* 2016; 4: 616-25.
37. Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenbergh JG, Gray Jr LE. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2007; 96: 335-45.
38. Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA. Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants. *J Pediatr* 1987; 111: 240-43.
39. Barrett E, Hoeger K, Sathyanarayana S, Abbott D, Redmon J, Nguyen R, Swan S. Anogenital distance in newborn daughters of women with polycystic ovary syndrome indicates fetal testosterone exposure. *J Dev Orig Health Dis* 2018; 9: 307-14.
40. Wu Y, Zhong G, Chen S, Zheng C, Liao D, Xie M. Polycystic ovary syndrome is associated with anogenital distance, a marker of prenatal androgen exposure. *Hum Reprod* 2017; 32: 937-43.

Original Article

Expression of Luteinizing Hormone (LH) Receptor Gene in the Ovary of a Prenatally-Androgenized Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome Following Androgen Exposure in the Prenatal Period

Noroozadeh M¹ , Salehi Jahromi M² , Gholami H³ , Ramezani Tehrani F¹ 

¹Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ²Department of Physiology and Pharmacology, Center for Diabetes and Endocrine, Research College of Medicine, University of Toledo, OH, USA, ³Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: ramezani@endocrine.ac.ir

Received: 15/08/2021 Accepted: 01/12/2021

Abstract

Introduction: Based on available evidence, exposure of the female fetus to androgens during the prenatal period, by affecting the expression of some genes, can cause polycystic ovary syndrome (PCOS) in adulthood. On the other hand, changes in luteinizing hormone (LH) levels and its receptor are associated with the risk of reproductive disorders, including PCOS. The present study aimed to evaluate the expression of the LH receptor gene in the ovaries of a rat model of PCOS induced by androgen exposure in the prenatal period. **Materials and Methods:** In adult rats with PCOS and controls (eight animals in each group), different phases of the sexual cycle (estrous cycle) were determined using vaginal smears, and the anogenital distance (AGD) was measured using a vernier caliper. Ovarian granulosa cells were isolated, and RNA was extracted. The LH receptor gene expression levels in these cells were determined using the real-time polymerase chain reaction (PCR). Data were analyzed by GraphPad Prism software. **Results:** Irregular and longer sexual cycles, an increase in AGD (17.32 ± 17.03 vs. 11.73 ± 0.26 mm ($P=0.0001$)), and a decrease in LH receptor gene expression ($42. \pm 0.12$ vs. $0.88 (0.13)$ ($P=0.02$)) were observed in the adult rat model of PCOS compared to controls. **Conclusion:** A decrease in LH receptor gene expression in the ovarian granulosa cells may be one of the mechanisms involved in the pathophysiology of PCOS following prenatal exposure of the female fetus to androgens.

Keywords: Androgen, Fetal life, LH receptor, Polycystic ovary syndrome, Rat