مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و سوم، شماره‌ی ۲، صفحه‌های ۹۱ ـ ۸۱ (خرداد ـ تیر ۱۴۰۰)

مقاله‌ی پژوهشی

تاثیر مواجهه‌ی پیش از تولد با مقادیر اضافی آندروژن بر بیان ژن‌های آدیپونکتین و گیرنده‌های آن در تخمدان و سلول‌های گرانولوزای موش صحرایی مدل تخمدان پلی‌کیستیک

دکتر آزیتا زاده‌وکیلی[۱]، دکتر فهیمه رمضانی تهرانی[۲]، زهرا دانشیان[۳]، مهسا نوروززاده[۲]، دکتر مریم زرکش[۳]

۱) مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۲) مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۳) مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول اول**: مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، دکتر مریم زرکش، ، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول دوم**: مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، مهسا نوروززاده؛
e-mail: Zarkesh@endocrine.ac.ir
e-mail: mahsa_asal82@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بیان هورمون آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در تخمدان نقش تنظیم‌کننده‌ی سیستم زادآوری زنانه را برای آن مطرح کرده است. برای شناخت سازوکار بیماریزایی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (**PCOS**) و توضیح اثرات مواجهه پیش از تولد با آندروژن اضافی، بیان ژن آدیپونکتین (**AdipoQ**) و گیرنده‌هایش (**R1** و **R2**) در تخمدان و سلول‌های گرانولوزای موش‌های صحرایی مدل **PCOS** بررسی شد. مواد و روش‌ها: پنج موش صحرایی باردار از نژاد ویستار در گروه آزمون، در روز ۲۰ بارداری ۵ میلی‌گرم تستوسترون آزاد حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر روغن کنجد و بنزیل بنزوات، و ۵ موش در گروه شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر حلال دریافت کردند. بیان ژن‌های **AdipoQ**،**R1** و **R2** در زاده‌های ماده در سه نقطه زمانی؛ بدو تولد، ۱۰ و ۱۰۰روزگی (بلوغ) در نمونه‌های تخمدان و گرانولوزای زاده‌های بالغ، مورد بررسی قرار گرفتند. بیان نسبی ژن‌ها توسط **TaqMan real-time polymerase chain reaction** سنجیده شد. یافته‌ها: بیان ژن **AdipoQ** و گیرنده‌هایش در تخمدان موش‌های گروه آزمون، در بدو تولد، تفاوت آماری معنی‌دار با گروه شاهد نشان نداد. بیان **AdipoQ** در نمونه‌های تخمدان، ۱۰ روزگی (**P=۰/۰۰۱**) و پس از بلوغ (**P=۰/۰۰۸**) و در سلول‌های گرانولوزای زاده‌های بالغ گروه آزمون (**P=۰/۰۰۱**)، نسبت به میزان بیان در بدو تولد کاهش داشت. کاهش بیان گیرنده‌های **R1** و **R2** نیز در ۱۰روزگی نسبت به بدو تولد مشاهده شد (به ترتیب **P=۰/۰۴۶** و **P=۰/۰۰۱**). بیان **AdipoQ** و **R2** در تخمدان زاده‌های ۱۰روزه و گرانولوزای زاده‌های بالغ، نسبت به گروه شاهد کاهش داشت (**P<۰/۰۵**). نتیجه‌گیری: مواجهه‌ی پیش از تولد با آندروژن اضافی می‌تواند با تاثیر بر بیان تخمدانی آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در دوران پس از تولد و بلوغ، تنظیم عملکرد سیستم زادآوری را مختل ساخته و در سازوکار بیماریزایی **PCOS** نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: آدیپونکتین، گیرنده R1 آدیپونکتین، گیرنده R2 آدیپونکتین، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، آندروژن، مدل حیوانی

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۷ـ دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۰/۹/۱۰ ـ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۱۶

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)[i] یکی از ناهنجاری‌های غدد درون‌ریز است که وراثتی پیچیده دارد. افزایش سطح آندروژن در خون (هایپرآندروژنیزم)[ii]، وجود کیست‌های متعدد در تخمدان و ناکارآمدی تخمک‌گذاری نشانه‌های تشخیصی این سندرم می‌باشند.[۱]

مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط بارز میان چاقی و PCOS را نشان داده‌اند و ۳۸ تا ۸۸ درصد زنان مبتلا، دچار چاقی یا اضافه وزن هستند.[۲،۳] بنابراین، تغییرات عملکرد، التهاب و ترشح آدیپوکاین‌ها در بافت چربی مبتلایان به PCOS، به منظور یافتن منشا این ارتباط، در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است.[۴،۵] یکی از آدیپوکاین‌های مطرح در این زمینه، آدیپونکتین[iii] (AdipoQ) و گیرنده‌های آن (R1 و R2) می‌باشد. آدیپونکتین موجب بهبود حساسیت به انسولین، تسریع اکسیداسیون اسیدهای چرب در بافت‌های پاسخ گو به انسولین و کاهش التهاب می‌شود.[۴] در زنان PCOS غلظت آدیپونکتین در خون به صورت معنی‌داری کمتر از مقدار مشابه در زنان سالم گزارش شده است.[۵] از آنجا که تصور می‌شد آدیپونکتین به طور انحصاری توسط سلول‌های چربی بیان می‌شود،[۶] تغییرات این هورمون در بیماران PCOS تنها در زمینه‌ی تغییرات وزن بررسی و تفسیر می‌گردید. نتایج پژوهش‌های اخیر موید بیان آدیپونکتین و گیرنده‌های آن (در سطح ژن و پروتئین) در هیپوتالاموس و هم‌چنین بخش‌های مختلف از تخمدان؛ مانند مایع فولیکولی، تخمک، سلول‌های تکا[iv] (TCs) و سلول‌های گرانولوزا[v] (GCs) در پستانداران مختلف می‌باشد.[۷-۹] مشاهدات مختلف گویای حضور آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در تمام مراحل چرخه جنسی یا استروس[vi] جانوران و نقش آن در پیشرفت مراحل متفاوت از بلوغ تخمک می‌باشد.[۱۰-۱۲] این یافته‌ها، آدیپونکتین را به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی اصلی دستگاه تولید مثل زنانه معرفی می‌نمایند.[۱۳] لاگالی[vii] و همکارانش با مطالعه‌ی سلول‌های تکا و گرانولوزای کشت داده شده نشان دادند که آدیپونکتین موجب تغییر در بیان گیرنده‌ی LH و تولید استروئیدها می‌شود.[۱۰] در مطالعه‌ی چابرول[viii] نیز GCهای جدا شده از تخمدان انسان و موش صحرایی در محیط کشت، در حضور فاکتور رشد شبه انسولینی، مقادیر بیشتری از پروژسترون و استرادیول را در پاسخ به آدیپونکتین تولید کردند.[۱۴] به این جهت، رویکرد تازه‌ای در بررسی تغییرات بیان این ژن و گیرنده‌های آن در PCOS، برای دستیابی به سبب‌شناسی دقیق بیماری، مطرح شده است.

نتایج مطالعات مختلف در انسان و حیوانات بر منشا تکوینی[ix] سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دلالت دارد و نشان می‌دهد که چگونگی شرایط محیطی در دوران جنینی و اوایل دوران پس از تولد، بر شکل‌گیری فنوتیپ بیماری در بزرگسالی موثر است.[۱۵،۱۶] عوامل محیطی، با واسطه‌ی فرایندهای اپی‌ژنتیک، بیان ژن‌ها را متاثر ساخته و با ایجاد تغییر در برنامه‌ریزی رشد و تکامل بافت‌ها و اندام‌ها، به شکل‌گیری فنوتیپ‌ها می‌انجامند. از آن جا که، این فرایندها در طی زمان رخ می‌دهند، بنابراین، بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف از رشد و تکامل می‌تواند ما را در توضیح چگونگی شکل‌گیری فنوتیپ‌ها، از جمله بیماری‌ها، راهنمایی نماید.

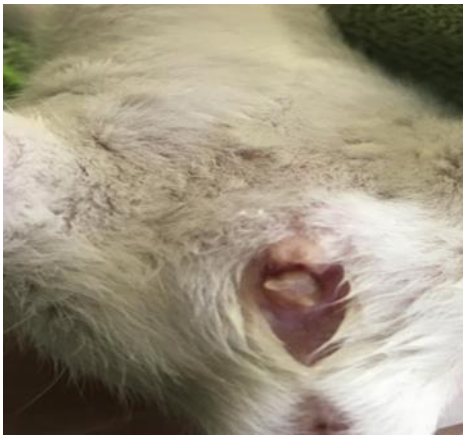
ما در پژوهش‌های پیشین موفق شدیم با استفاده از مواجه‌سازی جنین موش‌های صحرایی با مقادیر اضافی از آندروژن، مدلی برای PCOS ارائه نماییم.[۱۷] این موش‌ها در بزرگسالی دارای تخمدان پلی‌کیستیک، اختلال سیکل جنسی، کاهش تخمک‌گذاری، افزایش وزن بدن، افزایش LH، افزایش سطح تستوسترون و اختلالات متابولیک منتسب به PCOS بودند.[۱۸،۱۹] با توجه به اهمیتی که مجموعه‌ی آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در تنظیم دستگاه تولیدمثل زنانه یافته‌اند، هدف از پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن آدیپونکتین و گیرنده‌های آن، در زمان‌های مختلف از زندگی موش‌های صحرایی مدل PCOS، در بافت تخمدان بود. هم‌چنین، با توجه به یافته‌های مرتبط با نقش آدیپونکتین در تنظیم عملکرد سلول‌های گرانولوزا[۲۰] و هم‌چنین، تاثیر این سلول‌ها بر فرایند تولید استروئیدها توسط سلول‌های تکای تخمدان،[۲۱] بررسی بیان ژن‌های مورد نظر در GCها نیز در اهداف مطالعه قرار گرفت.

i -Polycystic Ovary Syndrome
ii- Hyperandrogenism
iii -Adiponectin
iv -Theca cells
v -Granulosa cells
vi -Estrous cycle
vii -Lagaly
viii -Chaberolle
ix -Developmental origin

مواد و روش‌ها

تأییدیه اخلاق: در مطالعه حاضر، مراقبت و نگه‌داری از حیوانات مطابق با اصول و استانداردهای نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت. انجام این طرح تحقیقاتی توسط کمیته اخلاق پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد IR.SBMU.RIES.REC.1395.136 مورد تأیید قرار گرفت و تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شدند.

حیوانات و شرایط نگه‌داری: در مطالعه حاضر، ده سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار (در محدوده وزنی ۱۹۰-۱۷۰ گرم و محدوده سنی ۹۵-۷۵ روز) از مرکز حیوانات پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز 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 پلی‌اتیلن به مدت یک شبانه روز در شرایط استاندارد و مناسب برای نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی (چرخه نوری، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای کنترل شده ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵-۴۵ درصد) نگه‌داری شدند. مشاهده پلاگ واژنی (واژینال پلاگ) پس از جفت گیری، به عنوان اولین روز حاملگی در نظر گرفته شد (شکل۱).

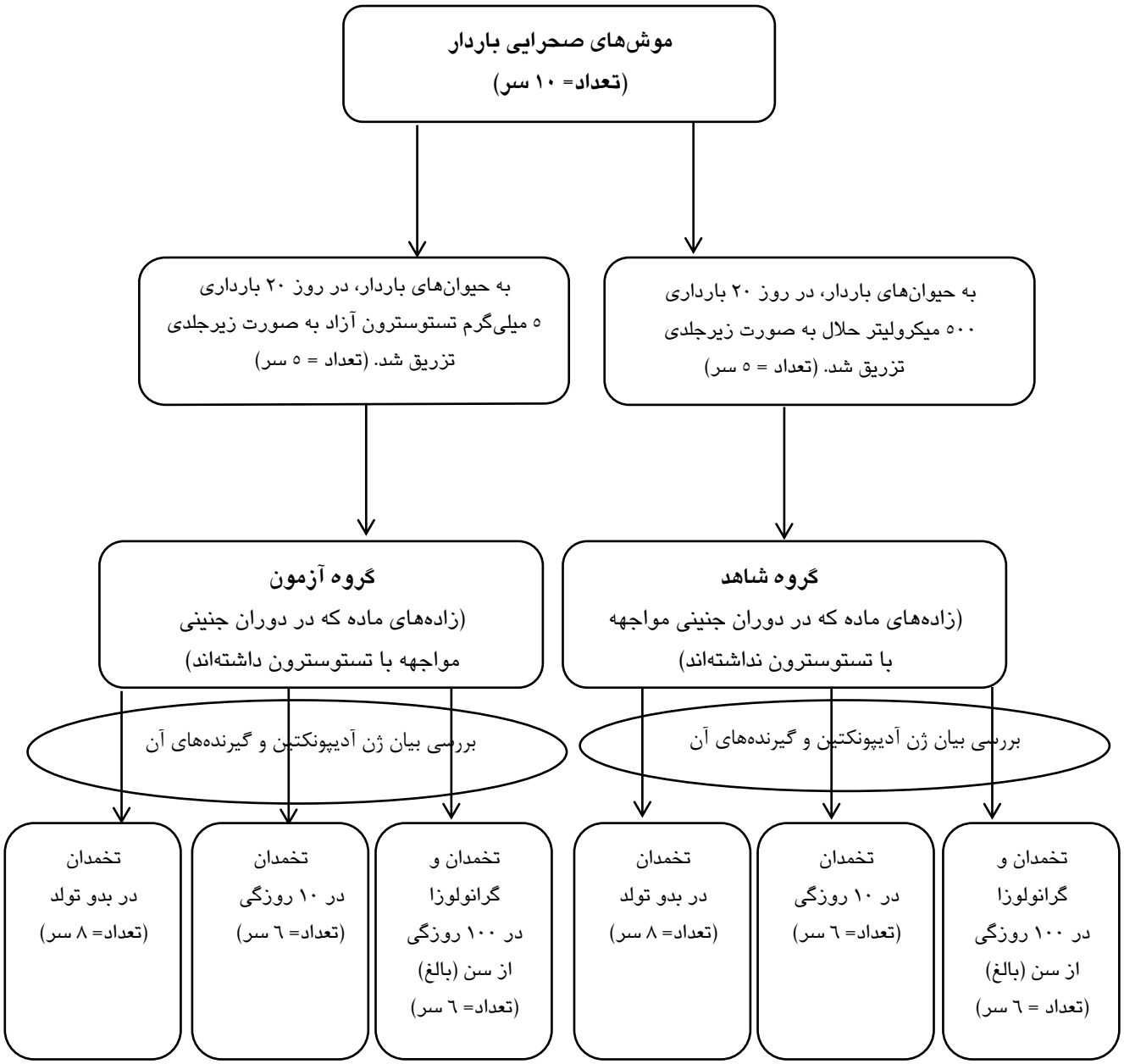


شکل ۱- عکس از پلاگ واژینال؛ تشکیل پلاک واژینال به عنوان روز اول بارداری در نظر گرفته شد.

موش‌های صحرایی باردار به طور تصادفی به دو گروه آزمایشی و شاهد تقسیم شدند (۵ سر حیوان در هر گروه). 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 طریق مادر در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند، به عنوان گروه آزمون (مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (تعداد =۲۰ سر)) و زاده‌های ماده‌ای که در دوران جنینی مواجهه با تستوسترون نداشته‌اند، به عنوان گروه شاهد (تعداد=۲۰ سر)، در نظر گرفته شدند و این تعداد زاده ماده از هر گروه (۲۰ سر زاده ماده) به سه گروه بر اساس نقطه زمانی که نمونه‌گیری ها انجام شدند (بدو تولد، ۱۰ روزگی و ۱۰۰ روزگی از سن) تقسیم‌بندی شدند. از هر مادر؛ برای سه نقطه زمانی، زاده‌های ماده به طور تصادفی و بدون در نظر گرفتن معیار خاصی انتخاب شد. در بدو تولد به علت این که حجم و ابعاد تخمدان خیلی کوچک می باشد، از هر گروه ۸ تخمدان (۸ حیوان) در نظر گرفته شد و در دو نقطه زمانی دیگر (۱۰ روزگی و ۱۰۰ روزگی از سن) از هر گروه ٦ تخمدان (٦ حیوان) در نظر گرفته شد. گروه‌بندی حیوان‌ها در شکل ۱ مشخص شده است.

القا مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک: به منظور تولید مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS، همان‌طور که در مطالعات قبلی‌مان گزارش شده است،[۱۷،۱۸] حیوان‌های باردار در گروه آزمایشی، در روز ۲۰ بارداری از طریق تزریق زیرجلدی، ۵ میلی‌گرم تستوسترون آزاد (T-1500، سیگما، آلمان) حل شده در ۰/۵ میلی‌لیتر روغن کنجد (S3547، سیگما، آلمان) و بنزیل بنزوات (B6630، سیگما، آلمان) به نسبت ٤ به ۱ به عنوان حلال، دریافت کردند. در حالی که، به حیوان‌های باردار در گروه شاهد فقط ۰/۵ میلی‌لیتر از حلال تزریق شد. تعیین زمان تجویز و دوز آن بر اساس داده‌هایی که قبلاً منتشر شده است، انجام شد.[۱۸] زاده های ماده حاصل از دو گروه در سه نقطه زمانی، بدو تولد (تعداد=۸)، ۱۰ روزگی (تعداد=٦) و پس از بلوغ (۱۰۰ روزگی (تعداد=٦)) از نظر میزان بیان ژن‌های آدیپونکتین و گیرنده‌های آن در تخمدان‌ها و سلول‌های گرانولوزا (فقط در حیوان بالغ) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. زاده‌های ماده‌ای که در دوره پیش از تولدشان در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند به عنوان مدل PCOS در نظر گرفته شدند (شکل ۲).



شکل ۲- فلوچارت مربوط به گروه‌بندی حیوان‌ها

توزین حیوانات: تمامی حیوانات پیش از نمونه‌گیری توسط ترازوی دیجیتال (A & D co., LTD. JAPAN P1502601) با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند.

جداسازی تخمدان ها: پس از قطع سر حیوان در بدو تولد، شکم حیوان باز شده و تخمدان‌ها با استفاده از قیچی و پنس سترون خارج شده و در میکروتیوب‌های عاری از RNase، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفته و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در ۱۰ و ۱۰۰ روزگی از سن، پس از قربانی کردن حیوان به روش جابجایی مهره‌های گردن[i]، بلافاصله شکم حیوان باز شده و تخمدان‌ها استخراج و در شرایط ذکر شده نگه‌داری شدند. در حیوانات بالغ، یک تخمدان به صورت دست نخورده در میکروتیوب عاری از RNase قرار گرفت، در نیتروژن مایع غوطه ور و سپس به فریزر ۸۰- منتقل گردید. تخمدان دیگر

i- Cervical dislocation

برای استخراج سلول‌های گرانولوزا بـه محـیط کشـت RPMI 1640 منتقل شد.

جداسازی سـلول‌هـای گرانولـوزا از تخمـدان: از روش مرسوم خلیدن فولیکول[i] برای جداسازی سلول‌های گرانولوز استفاده شد.[۲۲،۲۳] هر تخمـدان پـس از جداسـازی چربـی‌هـای اطـراف آن در محلـولPBS [ii] سـرد، بـه ظـرف پتـری حـاوی محـیط کشـت RPMI 1640[iii] منتقـل شـد. در زیـر لـوپ، فولیکول‌های تخمدانی جداسازی و سپس توسط سـر سـوزن انسولین پاره شده و سلول‌های گرانولـوزا بـه همـراه تخمـک رها شـدند. تخمـک‌هـا بـه کمـک پیپـت دهـانی از سـلول‌هـای گرانولوزا جدا شدند. سوسپانسیون سلولی به فالکون عـاری از RNase منتقـل و در سـانتریفیوژ یخچـال‌دار در دمـای ٤ درجه سانتی‌گراد و با دور چرخشی ۳۰۰۰، به مـدت ٤ دقیقـه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به آهستگی جدا و دور ریختـه شد. مواد ته‌نشین شده، که حاوی سلول‌های گرانولوزا بودند، با ۳۰۰ میکرولیتر ترایـزول مخلـوط و در فریـزر ۸۰- درجـه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

استخـراج RNA و سنجـش بیـــان ژن بـه روش Taqman Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR (qRT-PCR):

استخراج RNA از تخمدان‌ها با استفاده از کیت استخراج RNeasy(کیـاژن، آلمـان) انجـام شـد. اسـتخراج RNA از سـلول‌هـای گرانولـوزا بـا اسـتفاده از روش ترایـزول طبـق پروتکل مربوطه انجام شد. سلول های گرانولـوزای اسـتخراج شده با ۳۰۰ میکرولیتر ترایزول مخلـوط و همـوژن گردیـد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا ادامـه آزمایشـات ذخیـره شد. پس از استخراج RNA، به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNAو آگـاهی از غلظـت و میـزان خـالص بـودن آن، جـذب نمونه RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (Nano Drop ND-1000، آمریکـا) در طـول مـوج‌هـای ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومول (nm) خوانده شد. بیان کمـی ژن‌هـای آدیپـونکتین و گیرنـده‌هـای آن (R1 و R2) توسـط TaqMan (qRT-PCR) بررسی شد. توالی پرایمرهـا و پـروب‌هـا در جـدول ۱ نشـان داده شده است.

جدول۱- توالی پرایمرها و پروب‌های مورد مطالعه

نام ژن	GenBank accession NO	توالی ('۳-'۵)	طول محصول (جفت باز)
آدیپونکتین	NM_144744.3	F:AATCCTGCCCAGTCATGAAG R:CATCTCCTGGGTCACCCTTA P:CCACTAATTCAGAGCAGCCCGTAGCCC	۲۱۵
R1	NM_207587.2	F:CTTCTACTGCTCCCCACAGC R:TCCCAGGAACACTCCTGCTC P:CCATGTGCATTCCTAGCAGTCACCTCAG	۱۳۹
R2	NM_001037979.1	F: AGATAGGCTGGCTAATGCTCATG R: AAGAAGCGCTCAGGGATACG P: CCTCTATATCACAGGAGCTGCCCTCTACGC	۸۲
β-Actin	NM_031144.3	F:CCGTGAAAAGATGACCCAGATC R:CACAGCCTGGATGGCTACGT P:TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG	۷۳

واکنش در حجـم ۲۵ میکرولیتـر حـاوی ۱۲/۵ میکرولیتـر (Probe-PCR Master Mix، کیـــاژن، آلمـــان)، ۰/۲۵ میکرولیتـــرRT-mix، ۰/۸میکرولیتـــر پرایمـــر پیشـــرو، ۰/۸ میکرولیتر پرایمر معکـوس، ۰/٦ میکرولیتـر پـروب، ۸/۰۵ آب عاری ازRNase و ۲ میکرولیتر از RNA کل و بـا اسـتفاده از دسـتگاه (Rotor-Gene 6000 Corbett Research، سـیدنی، استرالیا) انجام شد. مرحله واسرشت (۵ دقیقـه در ۹۵ درجـه سانتی‌گراد) و پس از آن از روش One-Step استفاده شـد (۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد سپس، ٤۵ ثانیـه در ٦۰ درجـه سانتی‌گراد) که ٤۰ بار تکرار گردید.

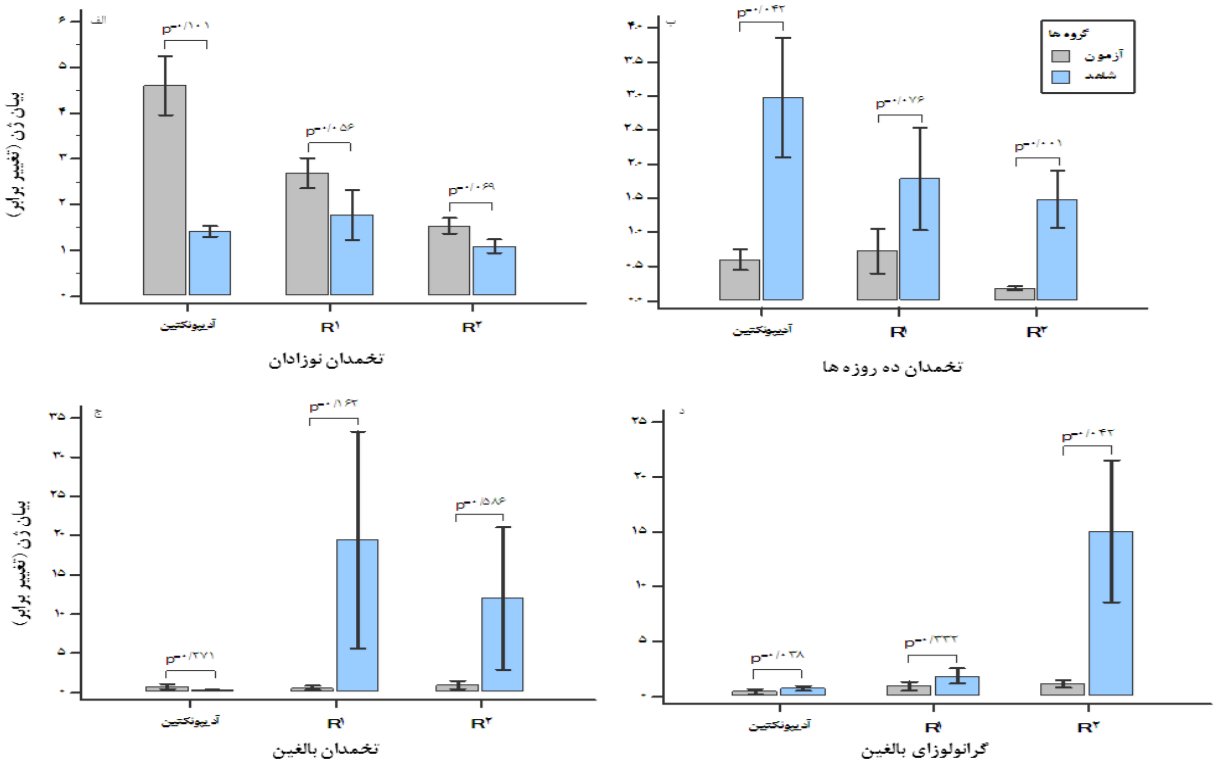
i -Follicle puncture
ii-Phosphate-buffered saline
iii- Roswell Park Memorial Institute Medium

برای هر ژن، نمونه‌های شاهد و آزمون به صورت تکراری[i] همراه با یک کنترل منفی گذاشته شد. مقدار نسبی mRNA در هر نمونه در مقایسه با Ct یا سیکل آستانه[ii] ژن مرجع که ژن بتا اکتین[iii] بود، محاسبه شد. بیان نسبی در حیوانات تیمار شده و کنترل آن‌ها توسط تجزیه و تحلیل بیان نسبی با استفاده از روش $2^{-\Delta Ct}$ محاسبه شد.[۲۴]

تجزیه و تحلیل آماری: نرمال بودن متغیرها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. برای مقایسه‌ی میانگین متغیرهای کمی با توزیع نرمال از آزمون تی (وزن حیوانات) و برای مقایسه میانه‌ی متغیرهای کمی با توزیع غیر نرمال (بیان ژن‌ها) از آزمون من ویتنی استفاده شد. مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در بین گروه‌های نوزادان (بدو تولد)، ۱۰ روزه‌ها و بالغین با استفاده از آزمون کروسکال-والیس انجام شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در دو گروه آزمون و شاهد، میانگین±انحراف استاندارد وزن نوزادان به ترتیب ۰/۷۹±۵/۸۳ و ۰/۳۹±۵/۸۵ گرم (P=۰/۹۰۷)؛ ۱۰ روزه‌ها ۳/۳۵±۲۱/۲۹ و ۶/۸۳±۲۴/۵۸ گرم (P=۰/۰۳۶) و در بالغین به ترتیب ۲۰/۴۰±۱۹۴/۱۱ و ۱۳/۲۰±۱۷۹/۳۳ گرم بود (P=۰/۰۱۸). در بافت تخمدان موش‌های نوزاد تازه متولد شده، آزمون آماری من ویتنی سطح بیان نسبی ژن‌های آدیپونکتین (۳/۴۲ آزمون در مقابل ۱/۴۳ شاهد)، R1 (۲/۶۹ آزمون در مقابل ۱/۷۷ شاهد) و R2 (۱/۵۳ آزمون در مقابل ۱/۰۹ شاهد) در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (به ترتیب P=۰/۱۰۱، P=۰/۰۵۶، P=۰/۰۶۹) (نمودار ۱).

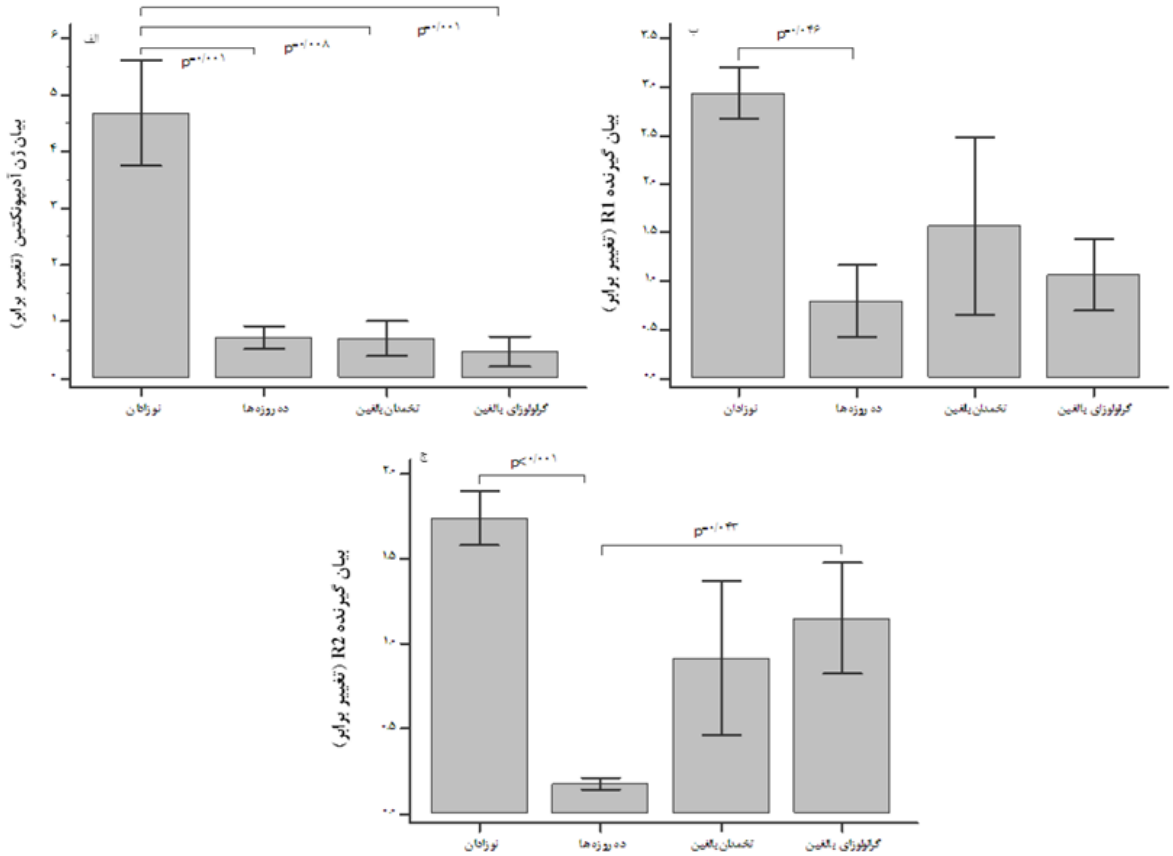


نمودار ۱- بیان نسبی ژن آدیپونکتین و گیرنده‌های آن (R1 و R2) در بافت الف) تخمدان نوزادان تازه متولد شده، ب) ۱۰ روزه‌ها و ج) بالغین و د) بافت گرانولوزای بالغین در موش‌های مواجه شده با آندروژن اضافی در دوران جنینی و شاهد

i -Duplicate
ii -Threshold cycle
iii-B-actin

در همین حال، در تخمدان موش‌های ۱۰ روزه، بیان ژن‌های آدیپونکتین (۰/۵۳ آزمون در مقابل ۲/٦٦ شاهد) و R2 (۰/۱۸ آزمون در مقابل ۱/٤۸ شاهد) در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P=۰/۰٤۲ و P=۰/۰۰۱)، لیکن تغییر بیان ژن R1 (۰/٦۳ آزمون در مقابل ۲/۰۱ شاهد) معنی‌دار نبود (P=۰/۰۷٦) (نمودار ۱). هم‌چنین، بیان ژن‌های آدیپونکتین (۰/۷۰ آزمون در مقابل ۱۰/٦٥ شاهد)، R1 (۲/۱٤ آزمون در مقابل ۱۷/٤۱ شاهد) و R2 (۲/۳۸ آزمون در مقابل ۲/۸۸ شاهد) در بافت تخمدان بالغین تغییر معنی‌داری را نشان نداد (به ترتیب P=۰/۲۷۱، P=۰/۱٦۲ و P=۰/۵۸٦). در نمونه‌ی سلول‌های گرانولوزای بالغین، بیان ژن‌های آدیپونکتین (۰/٤۱ آزمون در مقابل ۱/۳۷ شاهد) و R2 (۱/۱٥ آزمون در مقابل ۱٥/۰٤ شاهد) در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P=۰/۰۳۸ و P=۰/۰٤۲)، اما تغییر معنی‌دار در بیان ژن R1 (۱/۰۷ آزمون در مقابل ۲/۲٥ شاهد) مشاهده نشد (P=۰/۳۳۲) (نمودار ۱).

تفاوت‌های بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بین گروه‌ها با استفاده از آزمون کروسکال-والیس تجزیه و تحلیل گردید. نتایج نشان داد که بیان آدیپونکتین در تخمدان تمام گروه‌ها و هم‌چنین سلول‌های گرانولوزای بالغین نسبت به تخمدان نوزادان کاهش معنی‌دار داشت (P<۰/۰٥) (نمودار ۱). در مورد بیان گیرنده‌های R1 و R2 این کاهش معنی‌دار در بین گروه‌های نوزاد و ۱۰ روزه نیز مشاهده شد (به ترتیب P=۰/۰٤٦ و P<۰/۰۰۱). از سوی دیگر بیان گیرنده‌ی R2 در سلول‌های گرانولوزا نسبت به نمونه‌ی تخمدان موش‌های ۱۰ روزه افزایش معنی‌داری یافته است (P=۰/۰٤۳). بیان این گیرنده‌ها در نمونه‌های تخمدان موش‌های بالغ تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها نشان نداد (نمودار ۲)



نمودار ۲- بیان نسبی ژن آدیپونکتین و گیرنده‌های آن (R1 و R2) در بافت تخمدان نوزادان تازه متولد شده، ۱۰ روزه ها و بالغین و بافت گرانولوزای بالغین

بحث

یافته‌های مطالعات در سال‌های اخیر حاکی از حضور هورمون آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در تخمدان و سلول‌های مختلف آن می‌باشد و نقش تنظیم‌کننده‌ی سیستم زادآوری زنانه را برای این هورمون پیشنهاد می‌کند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مواجهه‌ی پیش از تولد با آندروژن اضافی بیان ژن AdipoQ و گیرنده‌هایش را در تخمدان و سلول‌های گرانولوزا، در مراحل مختلف رشد؛ به شکل متفاوتی متاثر می‌سازد. در حالی‌که، بیان ژن‌های آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در تخمدان و سلول‌های گرانولوزای زاده‌های موش‌های گروه آزمون، در بدو تولد، تفاوتی با گروه شاهد نداشت، لیکن، بیان آدیپونکتین در نمونه‌های تخمدان گروه آزمون، ۱۰ روز پس از تولد و پس از بلوغ و در سلول‌های گرانولوزای زاده‌های بالغ این گروه، نسبت به بدو تولد کاهش داشت. این کاهش در بیان گیرنده‌های R1 و R2 نیز در ۱۰ روزگی مشاهده شد. بیان ژن آدیپونکتین و گیرنده‌ی R2 در تخمدان زاده‌های ۱۰ روزه و سلول‌های گرانولوزای زاده‌های بالغ، نسبت به گروه شاهد نیز کاهش داشت.

شواهد روزافزون نشان می‌دهند که تغییرات در محیط رشد پیش از تولد، از طریق سازوکارهای اپی‌ژنتیک موجب تغییر در بیان ژن‌ها شده و به بیماری‌های بزرگسالی، از جمله **PCOS**، می‌انجامند.[۱۶،۲۵] مطالعه بر روی موش صحرایی، موش، گوسفند و پریمات‌های غیر انسان ماده‌ای که پیش از تولد در معرض آندروژن اضافی قرار گرفتند، نیز نشان داده که زاده‌های این حیوانات در بزرگسالی مشخصات اصلی PCOS را نمایان ساختند.[۲۶] هر چند که کاربردی بودن مدل های حیوانی حاصل از آندروژنیزه کردن پیش از تولد در سبب‌شناسی PCOS پذیرفته شده است؛ لیکن دانش موجود درباره چگونگی تأثیر غلظت آندروژن بر تعیین فنوتیپ بیماری در بزرگسالی هنوز ناچیز است. با این که تغییرات ژن‌های زیادی در این رابطه بررسی شده است، لیکن ژن‌هایی که بتوان آن‌ها را تعیین‌کننده‌ی بنیادی در روند بیماری‌زایی دانست، هم‌چنان ناشناخته‌اند. به علاوه؛ در حالی که ارتباط این سندرم با چاقی و شاخص‌های آدیپوسیتی به خوبی شناخته شده است، اما هنوز بر سر تقدم و تاخر رخداد چاقی و سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نظرات متفاوت است. هم‌چنین، هنوز بر سر نقش چاقی در بیان ژن‌های آدیپونکتین در نسوج مختلف و تفاوت این اثر در زنان مبتلا به این سندرم در مقایسه با غیر مبتلایان اتفاق نظر وجود ندارد. در تازه‌ترین این مطالعات نشان داده شده است که میزان بیان آدیپونکتین در مایع فولیکولی زنان PCOS غیر چاق، تفاوتی با زنان غیر مبتلا نداشت، در حالی‌که، در زنان مبتلای چاق این مقادیر کمتر از زنان شاهد و میزان بیان R1 کمتر بود.[۲۷]

مرهی و همکاران در ۲۰۱۹ نشان دادند که آدیپونکتین با متاثر ساختن بیان ژن‌هایی که محصولاتشان برای نمو صحیح فولیکول‌ها و ذخایر تخمدان حیاتی است (مانند هورمون آنتی مولرین و کیس پپتین)، در فیزیولوژی تخمدان نقش ایفا می‌کند.[۲۸] موش‌های فاقد آدیپونکتین زادآوری کاهش یافته داشتند؛ که با اختلال در سیکل جنسی و مراحل فولیکوژنز همراه بود. آن‌ها هم‌چنین افزایش LH و تستوسترون در مرحله‌ی پروستروس را در این موش‌ها گزارش کردند. سیر تکاملی فولیکول‌ها در تخمدان موش صحرایی به این صورت است که در زمان تولد تا روز ۷ پس از تولد بیشترین تعداد فولیکول‌های موجود در تخمدان؛ فولیکول‌های ابتدایی یا پرایموردیال[i] هستند، که لایه‌ی ضخیمی در کورتکس پیرامونی تخمدان می‌سازند و در فضای میانی تخمدان، فولیکول‌های اولیه[ii]و به تعداد کمتری فولیکول ثانویه‌ی[iii] نابالغ مشاهده می‌شود. فولیکول ابتدایی از از اووسیت اولیه تشکیل می‌شود که با تک لایه‌ی از سلول‌های گرانولوزای مسطح، که گاهی گرانولوزای اولیه نیز خوانده می‌شود، پوشیده شده است. در فولیکول اولیه، اووسیت با تک لایه‌ای از سلول‌های گرانولوزای مکعبی پوشیده می شود و تعداد لایه‌های این سلول‌ها با رشد و بلوغ فولیکول، افزوده می‌شود. پیدایش سلول‌های تکا در لایه‌ی فوقانی فولیکول، مشخصه‌ی شکل‌گیری فولیکول ثانویه است که در فاصله‌ی زمانی روز ۸ تا ۱٤ پس از تولد ظاهر و بالغ می‌شوند. از روز ۱۵ تا ۲۱ زمان ظهور فولیکول‌های آنترال[iv] است که در آن اووسیت اولیه با چندین لایه سلول گرانولوزا و لایه‌ای از سلول‌های تکا پوشیده شده است و در طی زمان تا بلوغ، با افزایش اندازه؛ آماده‌ی تخمک‌گذاری می‌شوند.[۲۹] در مطالعه‌ی حاضر، شاهد کاهش بیان ژن آدیپونکتین در گروه آزمون، در تمام مراحل پس از تولد نسبت به بدو تولد بودیم (نمودار ۲). تغییرات بیان این ژن در مراحل پس از تولد

i- Primordial follicle
ii -Primary follicle
iii- Secondary follicle
iv -Antral follicle

می‌تواند به تفاوت در نسبت میان سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی فولیکول‌ها، که قابلیت تولید آدیپونکتین و گیرنده‌هایش را دارا هستند، نسبت داده شود. در بدو تولد، همان‌گونه ذکر شد؛ با سلول‌های گرانولوزا اولیه مواجه هستیم که به زودی جای خود را به گرانولوزا های مکعبی و بالغ می‌دهند. در انسان نشان داده شده است که پروفایل بیان ژن در گرانولوزا های فولیکول‌های ابتدایی از گرانولوزا های فولیکول اولیه متفاوت است.[۳۰] با توجه به یکسان بودن کلیات فرایند رشد و بلوغ فولیکول‌ها در پستانداران، احتمال می‌رود چنین تفاوتی در بیان ژن‌ها در فولیکول‌های موش صحرایی نیز وجود داشته باشد و لذا فزونی میزان بیان AdipoQ در تخمدان موش‌های تازه متولد شده نسبت به دو گروه دیگر، و حتی نسبت به گرانولوزاهای جدا شده از تخمدان بالغ، می‌تواند ناشی از تفاوت در وضعیت تکاملی گرانولوزا ها باشد.

کامین و همکاران در ۲۰۱۳ نشان دادند که سلول‌های تکای جدا شده از تخمدان گوساله؛ در محیط کشت تیمار شده با غلظت‌های متفاوت از AdipoQ، در پاسخ به افزایش مقادیر این هورمون؛ مقادیر کمتری از گیرنده‌ی LH را بیان می‌کنند و آندروستندیون[i] کمتری نیز می‌سازند. خاموش کردن ژن گیرنده‌ها موجب فزونی یافتن تولید آندروستندیون شد.[۳۱] در مطالعه‌ی حاضر بیان آدیپونکتین و گیرنده‌ی R2 در ده روزگی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد (P=۰/۰۴۲)، در حالی‌که این تغییر در بدو تولد و در موش‌های بالغ معنی‌دار نبود. فقدان این تفاوت در بدو تولد می‌تواند به واسطه‌ی عدم تکامل چرخه‌ی جنسی و فولیکولوژنز باشد. در موش‌های بالغ نیز عدم مشاهده‌ی تغییر معنی‌دار می‌تواند ناشی از عدم تفکیک اندازه‌گیری بر اساس مراحل سیکل جنسی باشد؛ چرا که همان‌گونه که پیشتر ذکر شد؛ مطالعات گروه چنگ و مالسزکا نمایانگر بیان وابسته به مراحل چرخه جنسی در حیوانات بود.[۳۲،۳۳] بنابراین، ممکن است با توجه به کم بودن تعداد حیوانات، عدم هم فاز بودن آن‌ها و هم اندازه نبودن تغییرات در فازهای مختلف در بین گروه آزمون و شاهد، موجب عدم مشاهده‌ی تغییر معنی‌دار گردد. کاهش معنی‌دار بیان گیرنده‌ی R2 در موش‌های آزمون نسبت به شاهد با مشاهده‌ی کامین و همکاران از کاهش بیان گیرنده‌های آدیپونکتین در زنان مبتلا به PCOS هم‌خوانی داشت.[۳۱]

ساخته شدن استروئیدها در تخمدان حاصل عملکرد هماهنگ سلول‌های تکا و سلول‌های گرانولوزاست. مطالعات نشان داده است که کشت هم زمان سلول‌های تکا با گرانولوزا به افزایش استروئیدوژنز در TCs می‌انجامد[۳۴] و TCهای ایزوله تولید قابل توجهی از استروئید ندارند.[۲۱] هم‌چنین، عملکرد میتوکندری‌ها در GC اولین نقش کنترل‌کننده‌ی سرعت در بیوسنتز استروئیدهای تخمدان را عهده دار است.[۲۱،۳۵] بنابراین، مطالعه‌ی تغییرات سلول‌های گرانولوزا در شرایط هیپرآندروژنمی در حیوانات مدل PCOS، در شناسایی سازوکار بیماریزایی کمک‌کننده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ بر روی ۴۰ زن مبتلا به PCOS و ۴۰ زن غیرمبتلا صورت گرفت نشان داده شد که بیان مجموعه‌ی آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در سلول‌های گرانولوزای زنان مبتلا نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است.[۳۶] نتایج پژوهش ما نشان داد که بیان آدیپونکتین و گیرنده R2 در موش‌های بالغ گروه آزمون نسبت به گروه شاهد با کاهش نسبی مواجه بود.

در حالی‌که آدیپونکتین به عنوان تنظیم‌کننده‌ی عملکرد سیستم زادآوری زنانه معرفی می‌شود؛ لیکن هنوز سازوکار عملکرد آن به درستی شناخته نشده است. مطالعه بر روی سلول‌های گرانولوزای جدا شده از تخمدان گاو، در پاسخ به تیمار آدیپونکتین، افزایش بیان آنزیم StAR و کاهش بیان سیتوکروم p450 آروماتاز را نشان می‌دهند.[۳۶] آنزیم StAR با تنظیم ورود کلسترول به میتوکندری، مرحله‌ی محدودکننده‌ی سرعت در روند ساخت استروئیدها را نیز تنظیم می‌کند و آروماتاز مسئول تبدیل آندروژن تولید شده توسط سلول‌های تکا به استروژن است. بنابراین، تحریک GCs توسط آدیپونکتین، با واسطه‌ی آنزیم‌های فوق می‌تواند افزایش آندروژن را به همراه داشته باشد. هم‌چنین، آدیپونکتین می‌تواند بیان گیرنده‌ی LH و هم‌چنین بیان آنزیم CYP11A1 رت در سلول‌های تکای گاو را افزایش دهد.[۱۰]

از نقاط قوت اصلی این مطالعه، روش القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بود. در این روش با استفاده از مواجه‌سازی جنین موش‌های صحرایی با دوز ۵ میلی‌گرم از تستوسترون آزاد، مدل سازی به طور صددرصد اتفاق می‌افتد. در مدل ارایه شده؛ مشابه با نمونه‌های انسانی، ارگان‌های جنسی خارجی و داخلی در بدو تولد نمای مورفولوژیک غیر قابل افتراق از نمونه‌های مواجهه نیافته دارند؛ اما به تدریج تغییر کرده و پس از بلوغ دارای تخمدان

i -Androstenedione

پلی‌کیستیک، اختلال سیکل جنسی، کاهش تخمک‌گذاری، افزایش وزن بدن، افزایش LH، افزایش سطح تستوسترون و اختلالات منتسب به PCOS هستند.[۱۷،۱۸] یکی از مهم‌ترین عوامل قابل سنجش برای تأیید مواجهه با آندروژن در دوره پیش از تولد؛ افزایش فاصله مقعد تا برجستگی تناسلی در جنس ماده می‌باشد، که در این مدل موش صحرایی هماره به طور کامل اتفاق افتاده است. بر اساس طبقه‌بندی روتردام؛ به منظور تأیید ابتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، دست کم دو علامت از سه علامت زیر لازم می باشد که این علائم شامل اختلال در سیکل جنسی (اختلال در تخمک‌گذاری)، افزایش سطوح تستوسترون در سرم خون و یا تشکیل کیست‌های تخمدانی می‌باشند. در مدل ایجاد شده‌ی فوق‌الذکر، در صددرصد جنین‌های مواجهه یافته حداقل دو علامت از سه علامت مشاهده می‌گردد. به علاوه، در مطالعات پیشین بر روی این مدل، تغییرات در بیان سه ژن کلیدی در روند ساخت استروئیدها؛ شامل GAGT6، StAR و CYP17 مشاهده شده است.[۳۷] لذا، نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌تواند پاتوژنز احتمالی دیگری در رخداد این سندرم ارایه دهد. در اجرای این مطالعه با محدویت‌هایی مواجه بودیم: به دلیل عدم تامین منابع مالی،

آدیپونکتین و گیرنده‌هایش در سطح پروتئین اندازه‌گیری نشد، به علاوه محدودیت منابع به ما امکان هم زمان‌سازی حیوانات بر اساس مراحل چرخه‌ی جنسی و مقایسه‌ی بیان این ژن‌ها بر حسب مرحله‌ی جنسی اختصاصی را نداد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات تکمیلی با در نظر گرفتن این محدودیت‌ها اجرا گردد.

سپاسگزاری: از پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای تامین بودجه‌ی این پژوهش سپاس‌گزاری می‌شود.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. ESHRE TR, Group A-SPCW. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004; 81: 19-25.
2. Barber TM, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. Clinical Endocrinology 2021; 95: 531-41.
3. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. Human Reproduction Update 2012; 18: 618-37.
4. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. Reproduction 2015; 149: R219-27.
5. Shirazi FKH, Khodamoradi Z, Jeddi M. Insulin resistance and high molecular weight adiponectin in obese and non-obese patients with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). BMC Endocr Disord 2021; 21: 45.
6. Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. Mol Endocrinol 2008; 22: 1023-31.
7. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nature medicine 2004; 10: 524-9.
8. Pierre P, Froment P, Negre D, Rame C, Barateau V, Chabrolle C, et al. Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN. Human reprod 2009; 24: 2890-901.
9. Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. Reproduction 2007; 133: 719-31.
10. Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. Mol Cell Endocrinol 2008; 284: 38-45.
11. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. Endocrinology 2006; 147: 5178-86.
12. Szeszko K, Smolinska N, Kiezun M, Dobrzyn K, Maleszka A, Kaminski T. The influence of adiponectin on the transcriptomic profile of porcine luteal cells. Funct Integr Genomics 2016; 16: 101-14.
13. Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M. Adiponectin: A New Regulator of Female Reproductive System. Int J Endocrinol 2018; 2018: 7965071.
14. Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Fertil Steril 2009; 92: 1988-96.
15. Abbott D, Barnett D, Bruns C, Dumesic D. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? Hum Reprodn Update 2005; 11: 357-74.
16. Dumesic DA, Hoyos LR, Chazenbalk GD, Naik R, Padmanabhan V, Abbott DH. Mechanisms of intergenerational transmission of polycystic ovary syndrome. Reproduction 2020; 159: R1-r13.
17. Tehrani FR, Noroozzadeh 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.
18. Ramezani Tehrani F, Noroozzadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Hashemi S, Azizi F. The time of prenatal androgen exposure affects development of polycystic ovary syndrome-like phenotype in adulthood in female rats. Int J Endocrinol Metab 2014; 12: e16502.

19. Noroozzadeh M, Raoufy MR, Bidhendi Yarandi R, Faraji Shahrivar F, Moghimi N, Ramezani Tehrani F. Cardiac function and tolerance to ischemia/reperfusion injury in a rat model of polycystic ovary syndrome during the postmenopausal period. Life Sci 2020; 262: 118394.
20. Richards JS, Liu Z, Kawai T, Tabata K, Watanabe H, Suresh D, et al. Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human. Fertil ad Steril 2012; 98: 471-9.e1.
21. Strauss JF, Modi B, McAllister JM. Chapter 18 - Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis. In: Ulloa-Aguirre A, Conn PM, editors. Cellular Endocrinology in Health and Disease. Boston: Academic Press; 2014. p. 285-309.
22. Chen MC, Wang SW, Kan SF, Tsai SC, Wu YC, Wang PS. Stimulatory effects of propylthiouracil on pregnenolone production through upregulation of steroidogenic acute regulatory protein expression in rat granulosa cells. Toxicol Sci 2010; 118: 667-74.
23. Wang Q, Leader A, Tsang BK. Inhibitory roles of prohibitin and chemerin in FSH-induced rat granulosa cell steroidogenesis. Endocrinology 2013; 154: 956-67.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif) 2001; 25: 402-8.
25. Abbott DH, Kraynak M, Dumesic DA, Levine JE. In utero Androgen Excess: A Developmental Commonality Preceding Polycystic Ovary Syndrome? Front Horm Res 2019; 53: 1-17.
26. Paixão L, Ramos RB, Lavarda A, Morsh DM, Spritzer PM. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. Reprod Biol Endocrinol 2017; 15: 12.
27. Bongrani A, Mellouk N, Rame C, Cornuau M, Guérif F, Froment P, et al. Ovarian Expression of Adipokines in Polycystic Ovary Syndrome: A Role for Chemerin, Omentin, and Apelin in Follicular Growth Arrest and Ovulatory Dysfunction? Int J Mol Sci 2019; 20: 3778.
28. Merhi Z, Bazzi AA, Bonney EA, Buyuk E. Role of adiponectin in ovarian follicular development and ovarian reserve. Biomed Rep 2019; 1: 1-5.
29. Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. Toxicol Pathol 2015; 43: 343-53.
30. Ernst EH, Franks S, Hardy K, Villesen P, Lykke-Hartmann K. Granulosa cells from human primordial and primary follicles show differential global gene expression profiles. Hum Reprod 2018; 33: 666-79.
31. Comim FV, Hardy K, Franks S. Adiponectin and its receptors in the ovary: further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. PloS One 2013; 8: e80416.
32. Cheng L, Shi H, Jin Y, Li X, Pan J, Lai Y, et al. Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice. Endocrinology 2016; 157: 4875-87.
33. Maleszka A, Smolinska N, Nitkiewicz A, Kiezun M, Dobrzyn K, Czerwinska J, et al. Expression of adiponectin receptors 1 and 2 in the ovary and concentration of plasma adiponectin during the oestrous cycle of the pig. Acta vet Hung 2014; 62: 386-96.
34. Liu X, Qiao P, Jiang A, Jiang J, Han H, Wang L, et al. Paracrine Regulation of Steroidogenesis in Theca Cells by Granulosa Cells Derived from Mouse Preantral Follicles. Biomed Res Int 2015; 2015: 925691.
35. Sreerangaraja Urs DB, Wu WH, Komrskova K. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. Int J Mol Sci 2020; 21: 3592.
36. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin M-F, Murphy BD. Adiponectin Induces Periovulatory Changes in Ovarian Follicular Cells. Endocrinology 2006; 147: 5178-86.
37. Jahromi MS, Hill JW, Tehrani FR, Zadeh-Vakili A. Hypomethylation of specific CpG sites in the promoter region of steroidogeneic genes (GATA6 and StAR) in prenatally androgenized rats. Life Sci 2018; 207: 105-9.

Original Article

Effect of Prenatal Hyperandrogenization on Expression of Adiponectin and its Receptors in Ovary and Granulosa Cells from the Rat Model of Polycystic Ovary

Zadeh-Vakili A[1], Ramezani Tehrani F[2], Daneshian Z[3], Norooz Zadeh M[2], Zarkesh M[3]

[1]Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [2]Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [3]Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: Zarkesh@endocrine.ac.ir
e-mail: mahsa_asal82@yahoo.com

Received: 29/09/2021 **Accepted**: 07/12/2021

Abstract

Introduction: The expression of adiponectin hormone and its receptors in the ovary suggests a regulatory role for this hormone in the female reproductive system. To identify the pathogenic mechanism of polycystic ovary syndrome (PCOS) and explain the effects of prenatal hyperandrogenization, the expression of the adiponectin gene (AdipoQ), and its receptors (R1 and R2) were assessed in the ovaries and granulosa cells (GCs) of PCOS rats. Materials and Methods: Five pregnant Wistar rats in the experimental group received 5mg of free testosterone dissolved in 0.5ml of sesame oil and benzyl benzoate on the 20th day of pregnancy, and five mice in the control group received 0.5ml of solvent. AdipoQ, R1, and R2 expression were examined in female offspring ovaries at birth, 10 and 100 days (puberty), and in GCs of adult offspring. Relative gene expression was measured by TaqMan real-time polymerase chain reaction. Results: The expression of AdipoQ and its receptors in the ovaries of experimental mice at birth did not show a statistically significant difference from the control group. AdipoQ expression in the ovaries of the experimental group showed a decrease ten days after birth (P=0.001), after puberty (P=0.008), and in GCs (P=0.001) compared to the expression level at birth. There was a decreased expression of R1 and R2 at ten days of age compared to birth (P=0.046 and 0.001, respectively). AdipoQ and R2 expression were reduced in 10-day-old ovaries and GCs of adult offspring compared to the control group (P<0.05). Conclusions: Prenatal hyperandrogenization could dysregulate the reproductive system by affecting AdipoQ, R1, and R2 ovarian expression after birth and puberty and play a role in the pathogenesis of PCOS.

Keywords: Adiponectin, R1 adiponectin receptor, R2 adiponectin receptor, Polycystic ovary syndrome, Androgen, Animal model