

## ADAMTS-1 Expression in Cumulus Cells: A Biomarker for Oocyte Maturity

Sepide Gohari Taban<sup>1</sup>, Iraj Amiri<sup>2</sup>, Massoud Saidijam<sup>3</sup>, Sara Soleimani Asl<sup>4</sup>, Mahnaz Yavangi<sup>5</sup>, Elham Khanlarzadeh<sup>6</sup>, Tayebe Artimani<sup>7,\*</sup>

<sup>1</sup> MSc in Anatomy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>2</sup> Professor of Anatomy, Endometrium and Endometriosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>3</sup> Professor of Molecular of Biology, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Anatomy, Endometrium and Endometriosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor of Obstetrics and Gynecology, Endometrium and Endometriosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>7</sup> Assistant Professor of Reproductive Biology, Endometrium and Endometriosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\* **Corresponding Author:** Tayebe Artimani, Endometrium and Endometriosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: artimani@umsha.ac.ir

### Abstract

Received: 24.09.2017

Accepted: 15.01.2018

#### How to Cite this Article:

Gohari Taban S, Amiri I, Saidijam M, Soleimani Asl S, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Artimani T. ADAMTS-1 Expression in Cumulus Cells: A Biomarker for Oocyte Maturity. *Avicenna J Clin Med.* 2018; 24(4): 263-269. DOI: 10.21859/ajcm.24.4.263.

**Background and Objective:** Cumulus cells regulate oocyte maturation through bilateral communication during follicular growth. Expression of disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs-1 (ADAMTS-1) is essential for structural remodeling during the follicle growth, to maintain normal granulosa cell layers in the follicles. Since limited studies have been performed on this issue, we aimed to evaluate the expression of ADAMTS-1 in human cumulus cells and the possible correlation between ADAMTS-1 expression and oocyte maturity.

**Materials and Methods:** Fifty infertile women aged 18-40 years undergoing in vitro fertilization (IVF) were recruited. The participants had tubal obstruction and/or their partners were diagnosed with male factor infertility. Cumulus cells were obtained immediately after the isolation of cumulus-oocyte complexes. Adams-1 and  $\beta$ -actin mRNA expression levels were measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

**Results:** PCR results showed expression of ADAMTS-1 in cumulus cells. qRT-PCR demonstrated an increased expression of ADAMTS-1 in cumulus cells of mature oocyte compared to the vesicle-stage (GV) oocyte ( $P=0.02$ ). It is worth mentioning that 5.14 was considered the cut-off point for determining the false and true negative results. Moreover, sensitivity and specificity of the ADAMTS-1 were 90% and 67%, respectively (an area under the ROC curve of 0.8).

**Conclusion:** ADAMTS-1 expression was remarkably lower in GV oocytes than the mature ones, and it can be considered as a specific biomarker in cumulus cells separated from oocytes for determining the rate of oocyte maturation.

**Keywords:** ADAMTS-1, Cumulus Cell, Oocyte Maturity

## بیان ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس: بیومارکری برای تعیین بلوغ اووسیت

سپیده گوهری تابان<sup>۱</sup>، ایرج امیری<sup>۲</sup>، مسعود سعیدی جم<sup>۳</sup>، سارا سلیمانی اصل<sup>۴</sup>، مهناز یاونگی<sup>۵</sup>، الهام خانلرزاده<sup>۶</sup>، طیبه آرتیمانی<sup>۷\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد آناتومی دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۲</sup> استاد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات آندومتر و آندومتریوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۳</sup> استاد بیولوژی ملکولی، مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات آندومتر و آندومتریوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۵</sup> دانشیار زنان و زایمان، مرکز تحقیقات آندومتر و آندومتریوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۶</sup> استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۷</sup> استادیار بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات آندومتر و آندومتریوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول: طیبه آرتیمانی، مرکز تحقیقات آندومتر و آندومتریوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: artimani@umsha.ac.ir

### چکیده

**سابقه و هدف:** سلول‌های کومولوس طی رشد فولیکولی از طریق برقراری ارتباط دوطرفه باعث تنظیم تکامل تخمک می‌گردد. بیان ADAMTS-1 طی رشد فولیکولی و به‌منظور طبیعی‌نگهداشتن لایه‌های سلول‌های گرانولوزا کاملاً ضروری می‌باشد. از آن جایی که مطالعات محدودی در این زمینه صورت گرفته است، هدف از مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس انسانی و ارتباط احتمالی آن با بلوغ تخمک می‌باشد.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۰۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر ۵۰ زن نابارور (با میانگین سنی ۴۰-۱۸ سال) که به‌دلیل انسداد لوله‌ای یا فاکتور مردانه، تحت درمان برای لقاح آزمایشگاهی قرار داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. بلافاصله پس از جداکردن کمپلکس کومولوس-اووسیت، سلول‌های کومولوس جدا و در ادامه با استفاده از تکنیک RT-PCR و real time PCR، میزان بیان ژن‌های ADAMTS-1 و  $\beta$ -actin اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** میزان بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس تخمک‌های مچور (MII) در مقایسه با تخمک‌های GV به‌طور معناداری بیشتر بود ( $P=0/02$ ). شایان ذکر است که عدد  $\Delta$ CT cut off point برای تعیین نتایج مثبت کاذب و حقیقی به‌دست آمد. علاوه‌براین، حساسیت و ویژگی تجمعی برای بیومارکر مورد مطالعه به‌ترتیب عبارت بودند از: ۹۰ درصد و ۶۷ درصد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ADAMTS-1 در تخمک‌های GV به‌دست‌آمده، بسیار پایین‌تر از میزان بیان ADAMTS-1 در اووسیت‌های رسیده است و ADAMTS-1 می‌تواند به‌عنوان مارکری اختصاصی در سلول‌های کومولوس جداشده از اووسیت در تعیین میزان بلوغ تخمک مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** بلوغ تخمک، ژن ADAMTS-1، سلول کومولوس

### مقدمه

آن به لحاظ رشد و تکامل کاملاً به یکدیگر وابسته می‌باشند [۳]. سلول‌های کومولوس از طریق اتصال منفذدار در طول رشد فولیکول و تخمک‌گذاری با اووسیت ارتباط برقرار می‌نماید که این ارتباط، یک ارتباط عملکردی دوطرفه است [۴، ۵]. برخی از اعمال سلول‌های کومولوس عبارت هستند از: هماهنگی رشد فولیکول با

سلول‌های کومولوس، زیرگروهی از سلول‌های گرانولوزا می‌باشند که اووسیت را در فولیکول آنترال احاطه کرده و نقش مهمی را در بلوغ اووسیت بر عهده دارند [۱، ۲]. تکامل فولیکول تخمدانی و تخمک‌گذاری در پستانداران، مراحل بسیار منظم و دقیقی داشته و اووسیت پستانداران و سلول‌های سوماتیک اطراف

[۱۵] و نیز از آن جایی که مطالعات محدودی در این زمینه انجام شده است، در مطالعه حاضر بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس و ارتباط آن‌ها با کیفیت تخمک و همچنین استفاده از آن به‌عنوان یک بیومارکر جهت تعیین وضعیت کیفیت تخمک مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

۵۰ زن نابارور ۱۸-۴۰ سال که برای تحریک تخمک‌گذاری به‌منظور انجام ICSI به مرکز تحقیقات اندومتر و اندومتریوزیس بیمارستان فاطمیه شهر همدان مراجعه کرده بودند، پس از اخذ رضایت‌نامه اخلاقی وارد مطالعه شدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان (به شماره: IR.UMSHA.REC.1394.499) مورد تأیید قرار گرفت.

شرکت‌کنندگان در مطالعه را زنان فاقد هرگونه بیماری تخمدان که به‌دلیل فاکتور مردانه یا فاکتور لوله‌ای به این مرکز مراجعه نموده و کاندید درمان با روش کمک‌باروری بودند، تشکیل دادند.

جهت انجام مطالعه، غلظت FSH و LH سرم در روز سوم سیکل با استفاده از کیت ایمنو اسی الکترو کیمینواسانس (ECLA) براساس دستورالعمل کارخانه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و به‌منظور تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از روش Long protocol، تمامی بیماران با آگونیست GnRH در اواسط فاز لوتئال سیکل قبلی تحت درمان قرار گرفتند [۱۶]. لازم به ذکر است که Recombinant FSH (Gonal-F, Merk Serno, Switzerland) برای تحریک تخمدانی طی سیکل IVF و ICSI مورد استفاده قرار گرفت و ارزیابی سونوگرافی رشد فولیکول‌ها و اندازه‌گیری مقادیر استرادیول (E2) در نمونه خون بیماران در روز ۱-۳ انجام شد. باید توجه داشت که دوز روزانه پس از سه تا پنج روز درمان براساس پاسخ تخمدانی تنظیم گردید و پس از شناسایی حداقل سه فولیکول غالب (قطر بیش از ۱۸-۲۰ میلی‌لیتر)، ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ واحد هورمون گنادوتروپین جفتی (HCG, Choriomon, IBS, Lungano, Switzerland) برای بیمار تجویز شد.

در ادامه، اوسیت‌ها با استفاده از سونوگرافی واژینال، ۳۴-۳۶ ساعت پس از تجویز HCG از تخمدان‌ها آسپیره گردیدند و به‌دنبال آن، ۳۴-۳۶ ساعت پس از تجویز HCG، مجموعه کومولوس-اوسیت (COC) جدا گردید. در این مرحله، اوسیت‌ها از نظر تکاملی با استفاده از استریو میکروسکوپ بررسی شدند و تخمک‌ها به دو دسته MII و GV تقسیم گردیدند. شایان توجه است که تخمک نابالغ با حضور GV گرد در وسط تخمک و وجود سلول‌های کومولوس فشرده در اطراف تخمک مشخص شده و تخمک بالغ یا MII با سلول‌های کومولوس زیاد و لایه زونا و اوپلاسم واضح شناسایی می‌گردند.

بلوغ اوسیت، تولید انرژی برای تکمیل تقسیم میوز در اوسیت، تحریک بلوغ مولکولی اوسیت و هسته آن، تنظیم رونویسی در اوسیت، تحریک انتقال آمینواسید و بیوسنتز استرول، توسعه گلیکولیز و محافظت از اوسیت [۶]. پس از تخمک‌گذاری، سلول‌های کومولوس ارتباط خود را با اوسیت حفظ می‌کنند تا بدین طریق، به‌دام‌انداختن کمپلکس اوسیت-کومولوس به‌وسیله مژه‌های اپیتلیوم اینفاندیولوم لوله رحم و انتقال به داخل لوله رحم تسهیل گردد [۷]. شایان ذکر است که میزان آپوپتوز در سلول‌های کومولوس اوسیت‌هایی که از نظر مورفولوژیکی غیرطبیعی هستند، بیشتر از اوسیت‌های نرمال می‌باشد [۸]. ژن‌های بسیاری در فرایندهای ذکرشده درگیر هستند که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ به‌ویژه بدین دلیل که آزادسازی و ترشح LH/HCG باعث القای بیان متوالی بسیاری از این ژن‌ها می‌گردد. البته، با وجود شناسایی و معرفی بسیاری از این ژن‌ها، هنوز شناسایی و فهم بسیاری از مراحل تخمک‌گذاری در انسان از قبیل استروئیدوژنیز، آزادسازی فولیکول و رشد و تکامل اوسیت امکان‌پذیر نمی‌باشد. ADAMTS1 (A Disintegrin and Metalloproteinase with a Thrombospondin Motif) گروهی از پروتئازها هستند که اعضای مختلف آن نقشی کلیدی در رشد اندام‌های تناسلی و طول دوره باروری دارند [۹]؛ تاکنون ۱۹ عضو از این خانواده کشف شده است. این آنزیم‌ها که در ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شوند، دارای عملکردهای مهمی از قبیل فرایند آسیب و ترمیم ماتریکس خارج سلولی، بازسازی، آنژیوژنز، تخمک‌گذاری و انعقاد می‌باشند [۱۰].

ADAMTS1 پروتئاز چندکاره‌ای است که در فولیکول پیش از تخمک‌گذاری در پستانداران ترشح می‌شود. مطالعات مختلف حاکی از آن هستند که ژن ADAMTS1 به‌وسیله ترشح LH/HCG و رسپتور پروژسترون، نشان‌دهنده افزایش بیان می‌باشد. در این راستا، آنالیز دقیق فعالیت تخمدان در موش‌ها نشان داده است که ADAMTS1، فاکتوری ضروری برای بازسازی ساختاری طی رشد فولیکول تخمدانی، ثبات و حفظ لایه‌های طبیعی سلول‌های گرانولوزا و لنف آنژیوژنیز می‌باشد [۱۱، ۱۲]. تاکنون اطلاعات محدودی در مورد بیان ADAMTS1 در تخمدان‌های انسان و ارتباط آن با نتایج باروری و تکامل اوسیت به‌دست آمده است. البته، با توجه به وظایف و نقش‌های آن در تخمدان و روند فولیکوژنیز، این فرضیه تقویت می‌گردد که احتمالاً اختلال در میزان تولید آن‌ها در اتیولوژی بیماری‌های تخمدان نقش داشته و تغییرات احتمالی آن‌ها می‌تواند توضیح‌دهنده توقف رشد فولیکولی و مشکلات تخمک‌گذاری در بیماران مبتلا به بیماری‌های تخمدان باشد [۱۳].

با توجه به اینکه عملکرد سلول‌های کومولوس می‌تواند منعکس‌کننده عملکرد اوسیت و به‌دنبال آن پتانسیل رشد رویان باشد [۱۴] و ضمن تأکید بر اینکه استفاده از سلول‌های کومولوس، یک روش غیرتهاجمی بوده و مشکلات اخلاقی ندارد

دیگر، بررسی کمی بیان ژن ADAMTS-1 توسط دستگاه LightCycler® 96 System, Roche, Germany) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توسط پژوهشگر طراحی و در کمپانی Bioneer ساخته شد، صورت گرفت. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. در ادامه، Real Time PCR روی حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR حاوی ۱۰ میکرولیتر ماسترمیکس سایبرگرین (Takara, Hapan)، ۱ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و ۱ میکرولیتر cDNA انجام شد. شایان ذکر است که پروفایل سیکل‌ها به شرح زیر صورت گرفت: ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه؛ ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه. افزون‌براین، نرمال‌سازی مقادیر CT به‌دست‌آمده با استفاده از ژن بتا-اکتین انسانی انجام شد. منحنی‌های Melting به‌دست‌آمده نیز جهت تأیید اختصاصیت PCR آنالیز و به‌منظور دستیابی به منحنی استاندارد از یک‌سری رقت لگاریتمی RNA استفاده گردید. در ادامه، نتایج با استفاده از روش مقایسه CT بررسی شد. به‌طور خلاصه، تفاوت در CT ( $\Delta CT$ ) بین ژن مورد نظر و ژن بتا-اکتین محاسبه شد و درنهایت، از روش  $\Delta\Delta CT$  برای ارزیابی میزان بیان ژن استفاده گردید. Fold change نیز به‌صورت ۲ به توان منفی  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد. در پایان، نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد بررسی قرار گرفت و به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه گردید.

سپس، هر اووسیت به‌طور جداگانه و مختصر در معرض هیالورونیداز قرار گرفت و به مدت ۳۰ ثانیه پیپتاژ شد تا بدین‌شکل، سلول‌های کومولوس از اووسیت جدا گردد. به‌منظور آنالیزهای بعدی، سلول‌های کومولوس استخراج‌شده از هر بیمار ابتدا دو مرتبه در محیط کشت فاقد آنزیم شستشو داده شد و سپس، دوبار در PBS سرد به مدت ۸ دقیقه با ۸۰۰g در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. در ادامه، کومولوس‌های گرفته‌شده از هر تخمک در تیوب‌های جداگانه در دمای ۸۰- نگهداری شد و به‌منظور انجام مراحل بعدی کار، سلول‌های کومولوس برگرفته از تخمک‌هایی با درجه بلوغ یکسان، در دو گروه تخمک متافاز ۲ و تخمک ژرمینال pool تقسیم گردید. در انتها، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 تجزیه و تحلیل شدند و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ لحاظ گردید.

پس از اضافه کردن ۱ سی سی آکازول (Accuzol) (ساخت شرکت Bioneer، کره جنوبی)، RNA براساس پروتکل استاندارد استخراج شد [۱۷] و آلودگی ژنومیک DNA با استفاده از DNase I (ساخت شرکت Fermentas، Lithuania و Vilnius) از کل RNA به‌دست آمده حذف گردید. سپس، وضعیت RNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و غلظت RNA توسط نانودراپ تعیین شد. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت فرمنتاز و براساس پروتکل کیت انجام شد (ساخت شرکت Fermentas، Lithuania و Vilnius). از سوی

جدول ۱: ویژگی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه توالی (bp)
ADAMTS-1	F: CCAGACCTTGTGCAGACCAT R: TCACTTTGCCTTGCCCTCAA	۲۴۴
$\beta$ -actin	F:AAGATCAAGATCATTGCT R:TAACGCAACTAAGTCATA	۱۷۷

## یافته‌ها

**بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس**  
ابتدا بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس به‌دست‌آمده از کمپلکس کومولوس-اووسیت زنان تحت تحریک تخمک‌گذاری جهت IVF/ICSI مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۱ نشان‌دهنده بیان ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس می‌باشد (شکل ۱).

سپس، به‌منظور بررسی ارتباط بین میزان تکامل اووسیت و میزان بیان ژن ADAMTS-1، گروه مورد مطالعه براساس بلوغ اووسیت به دو زیر گروه متافاز ۲ و تخمک ژرمینال تقسیم گردید و میزان بیان ژن در هر دو گروه مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن بود که میزان بیان ADAMTS-1 در گروه متافاز ۲ به‌طور معناداری بیشتر از گروه GV بوده است ( $P=0/02$ ) (شکل ۲).

افزون‌براین، به‌منظور ارزیابی توانایی تشخیصی ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس با میزان تکامل تخمک‌ها به‌عنوان یک

گروه‌های مورد مطالعه در محدوده سنی ۱۸-۳۹ سال با میانگین سنی  $30/32 \pm 5/7$  سال قرار داشتند و میانگین BMI در این گروه معادل  $25/36 \pm 4/3$  بود. همچنین، مقدار FSH پایه (IU)  $7/14 \pm 2/24$  و مقدار LH پایه (IU) برابر با  $5/18 \pm 2/64$  گزارش گردید. افزون‌براین، میانگین مدت‌زمان ناباروری افراد شرکت‌کننده در مطالعه معادل  $7/2 \pm 4/66$  بود و در پایان، تعداد  $4/64 \pm 2/88$  اووسیت از بیماران فوق به‌دست آمد.

از سوی دیگر، میزان FSH کل دریافتی توسط بیماران (IU) برابر با  $17234 \pm 490/6$  گزارش شد. در این مطالعه در مجموع، تعداد  $244 \pm 0/6$  اووسیت MII و  $37 \pm 0/2$  اووسیت GV به‌دست آمد و مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که از کل تخمک‌های به‌دست‌آمده، به‌صورت میانگین تعداد  $5/81 \pm 3/52$  تخمک متافاز ۲ و  $0/72 \pm 0/83$  تخمک ژرمینال (GV) به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲: مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه

متغیر	انحراف معیار ± میانگین
سن (سال)	۳۲/۳۰ ± ۷/۵
BMI	۳۶/۲۵ ± ۳/۴
FSH پایه (IU)	۱۴/۷ ± ۲۴/۲
LH پایه (IU)	۱۸/۵ ± ۶۴/۲
مدت زمان ناباروری	۲/۷ ± ۶۶/۴
تعداد اووسیت	۶۴/۴ ± ۸۸/۲
FSH کل دریافتی توسط بیماران (IU)	۱۷۲۳۴ ± ۶/۴۹۰
تعداد کل اووسیت MII	۲۴۴ ± ۶/۰
تعداد کل اووسیت GV	۳۷ ± ۲/۰
میانگین اووسیت MII به دست آمده از هر بیمار	۸۱/۵ ± ۵۲/۳
میانگین اووسیت GV به دست آمده از هر بیمار	۷۲/۰ ± ۸۳/۰

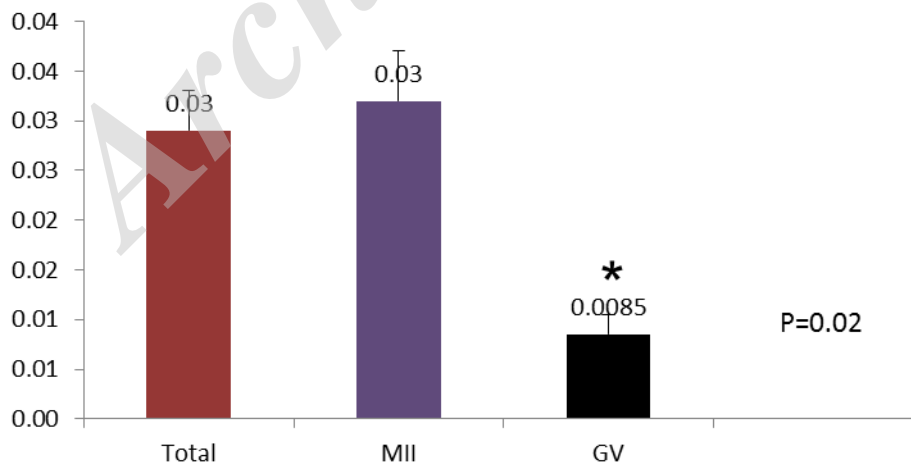
کандید مارکر از منحنی ROC استفاده گردید. آنالیز منحنی ROC نشان داد که میزان بیان ژن ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس تخمک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک مارکر احتمالی برای تشخیص میزان رسیدگی و تکامل تخمک با حساسیت ۹۰ درصد و اختصاصیت ۶۷ درصد (area under the ROC curve, AUC:0.8) در نظر گرفته شود.

علاوه بر این، مناسب‌ترین مقدار Cut off روی نقاط منحنی ROC با استفاده از اندکس youden (حساسیت + [۱۰۰ - ویژگی]) با محاسبه حداکثر مقدار تعیین گردید. در این راستا، مناسب‌ترین نقطه Cut off برای میزان  $\Delta$ CT ژن مذکور، ۵/۱۴ پیشنهاد می‌گردد.



شکل ۱: A: بتا-اکتینین؛ B: ADAMTS-1؛ C: NTC؛ D: Ladder

## ADAMTS-1



شکل ۲: بیان ژن ADAMTS-1 بر اساس بلوغ تخمک

## بحث

ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس زنانه که تحت تحریک تخمک‌گذاری به‌منظور انجام IVF/ICSI بودند، با استفاده از qRT-PCR مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

ADAMTS-1 در روند فولیکولوژنیز طبیعی و مراحل طبیعی‌گذاری دخالت داشته و نقش مهمی را در باروری زنان ایفا می‌کند [۱۱، ۱۲، ۱۸، ۱۹]. در مطالعه حاضر، میزان بیان

[۲۱] ارتباط معناداری را بین میزان بیان ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس و ظرفیت باروری گزارش نموده‌اند. بر مبنای یافته‌ها، ADAMTS-1، سیگنالینگ سلولی را از طریق تقسیم و رسیکان کنترل می‌کند و احتمالاً تجزیه فاکتورهای سیگنالینگ را در میان محیط داخلی اووسیت/کومولوس تحت تأثیر قرار داده و یا از استرس فیزیکی یا اکسیداتیو محافظت می‌نماید [۳۰].

شایان توجه است که حساسیت و ویژگی مقادیر  $\Delta ct$  زن ADAMTS-1 به عنوان یک مارکر کیفیت اووسیت در سلول‌های کومولوس با استفاده از آنالیز منحنی ROC تعیین گردید. در این زمینه، باید عنوان نمود که یانگ و همکاران نیز در مطالعه خود، ارتباطی را بین بیان این ژن و ظرفیت باروری گزارش کرده بودند [۲۱].

### نتیجه‌گیری

در مجموع، با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان گفت که ژن ADAMTS-1 در روند تکامل و رسیدن تخمک، نقش داشته و میزان آن در تخمک‌های بالغ که مناسب برای تزریق اسپرم و یا IVF هستند، بیشتر می‌باشد. از مقادیر به دست آمده برای بیان این ژن می‌توان به عنوان یک اندکس به منظور تعیین مچوریتی تخمک به دست آمده در انسان استفاده کرد. البته، به منظور اثبات بیشتر نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که از تحقیقات گسترده‌تر با حجم نمونه‌های بیشتر استفاده شود و مطالعاتی به منظور روشن‌تر شدن نقش و مسیر سیگنالینگ این ژن در سلول‌های کومولوس صورت گیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته آناتومی می‌باشد که طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ با هزینه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان در مرکز آندومتر و آندومتریوز بیمارستان فاطمیه همدان انجام گرفته است. بدین‌وسیله از زحمات و همکاری اعضا و کارشناسان مرکز تحقیقات یادشده و نیز مرکز پزشکی مولکولی صمیمانه تشکر می‌گردد. شایان ذکر است که نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارضی ندارد.

## REFERENCES

1. Dekel N, Beers WH. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol.* 1980;**75**(2):247-54. PMID: 6154623
2. Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol.* 1986;**113**(2):517-21. PMID: 3949077
3. Eppig JJ. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J Exp Zool.* 1979;**209**(2):345-53. PMID: 512597 DOI: 10.1002/jez.1402090216
4. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim*

نتایج نشان داد که ADAMTS-1 در سلول‌های کومولوس زنان با فعالیت طبیعی تخمدان وجود دارد. همچنین، مشاهده گردید که این میزان بیان در تخمک‌های MII که از مچوریتی و تکامل برخوردار هستند، در مقایسه با تخمک‌های GV بیشتر می‌باشد.

در مطالعات قبلی عنوان شده است که ADAMTS-1 توسط LH رسپتور پروژسترون تنظیم می‌گردد و تنظیم بیان این ژن به LH/HCG وابسته می‌باشد [۲۳-۲۰].

در این راستا، شوزو و همکاران در بررسی موش‌ها نشان دادند که ADAMTS-1، فاکتوری ضروری برای تکامل تخمک بوده و باعث حفظ و بقای لایه‌های سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌ها می‌شود. همچنین، آن‌ها در مطالعه خود عنوان نمودند که وقتی بیان ADAMTS-1 در موش‌ها مهار گردید، تعداد عروق خونی بزرگ در ناحیه میانی به شدت کاهش یافت که این امر احتمالاً حاکی از این موضوع مهم است که ADAMTS-1 در تشکیل شبکه عروق میانی مشارکت دارد [۱۱].

باید توجه داشت که ADAMTS-1 یک پروتئاز چندکاره است که بر اساس مطالعات قبلی در لایه سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های قبل از تخمک‌گذاری در موش [۲۵، ۲۴] و انسان [۲۶، ۲۱] گزارش شده است. در ارتباط با گاو و اسب نیز مشاهده شده است که ADAMTS-1 می‌تواند در سلول‌های تکا ترشح شود [۲۸، ۲۷].

البته، عدم آزادسازی LH به میزان کافی و بیان پایین پروژسترون در برخی از زنان می‌تواند منجر به فعالیت ناقص ADAMTS-1 گردد [۲۹].

لازم به ذکر است که ارتباط بین بیان ADAMTS-1 و کیفیت تخمک کاملاً روشن و مشخص نمی‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ADAMTS-1 در تخمک‌های GV به دست آمده، بسیار پایین‌تر از میزان بیان ADAMTS-1 در اووسیت‌های رسیده بوده است.

افزون‌براین، براون و همکاران [۱۲] طی مطالعه‌ای که در ارتباط با موش‌هایی که از نظر بیان ژن ADAMTS-1 مهار شده بودند صورت گرفت، گزارش نمودند که تخمک‌گذاری و در پی آن باروری، به شدت دچار مشکل شده است. همچنین، در مطالعه‌ای که به تازگی در ارتباط با انسان انجام شده است، یانگ و همکاران

*Reprod Sci.* 2004;**82-83**:431-46. PMID: 15271471 DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.017

5. Pangas SA, Matzuk MM. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod.* 2005;**73**(4):582-5. PMID: 15917343 DOI: 10.1095/biolreprod.105.042127
6. Fauser B, Diedrich K, Bouchard P, Dominguez F, Matzuk M, Franks S, et al. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2011;**17**(6):829-47. PMID: 21896560 DOI: 10.1093/humupd/dmr033
7. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2002;**61**(3):414-24. PMID: 11835587 DOI: 10.1002/mrd.10102

8. Yang YJ, Zhang YJ, Li Y. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertil Steril.* 2009;**62**(1):396.e1-6. [PMID: 19362300](#) [DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.010](#)
9. Russell DL, Brown HM, Dunning KR. ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biol.* 2015;**44-46**:54-63. [PMID: 25818315](#) [DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.007](#)
10. Demircan K, Cömertoğlu İ, Akyol S, Yiğitoğlu BN, Sankaya E. A new biological marker candidate in female reproductive system diseases: matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS). *J Turk German Gynecol Assoc.* 2014;**15**(4):250-4. [PMID: 25584036](#) [DOI: 10.5152/jtgga.2014.14206](#)
11. Shozu M, Minami N, Yokoyama H, Inoue M, Kurihara H, Matsushima K, et al. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol.* 2005;**35**(2):343-55. [PMID: 16216914](#) [DOI: 10.1677/jme.1.01735](#)
12. Brown HM, Dunning KR, Robker RL, Pritchard M, Russell DL. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. *Dev Biol.* 2006;**300**(2):699-709. [PMID: 17097630](#) [DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.10.012](#)
13. Xiao S, Li Y, Li T, Chen M, Xu Y, Wen Y, et al. Evidence for decreased expression of ADAMTS-1 associated with impaired oocyte quality in PCOS patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;**99**(6):E1015-21. [PMID: 24646063](#) [DOI: 10.1210/jc.2013-4177](#)
14. Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, De Sousa PA, et al. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction.* 2009;**138**(4):629-37. [PMID: 19602522](#) [DOI: 10.1530/REP-09-0144](#)
15. Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, et al. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod.* 2010;**25**(5):1259-70. [PMID: 20228394](#) [DOI: 10.1093/humrep/deq049](#)
16. European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 2001;**16**(4):644-51. [PMID: 11278211](#)
17. Al-Delemi DH, Al-Gewary AK, Ali Jeddo ZM. Identification of the expression level to LH-r gene in dominant and cystic ovarian follicles cells of the cows. *J Dairy Vet Anim Res.* 2014;**1**(3):17.
18. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest.* 2000;**105**(10):1345-52. [PMID: 10811842](#) [DOI: 10.1172/JCI8635](#)
19. Mittaz L, Russell D, Wilson T, Brasted M, Tkalcevic J, Salamonsen L, et al. Adams-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod.* 2004;**70**(4):1096-105. [PMID: 14668204](#) [DOI: 10.1095/biolreprod.103.023911](#)
20. Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;**97**(9):4689-94. [PMID: 10781075](#) [DOI: 10.1073/pnas.080073497](#)
21. Yung Y, Maman E, Konopnicki S, Cohen B, Brengauz M, Lojkin I, et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and cumulus marker for fertilization capacity. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;**328**(1-2):104-8. [PMID: 20655981](#) [DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.019](#)
22. Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, et al. Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids.* 2000;**65**(10):559-70. [PMID: 11108860](#)
23. Doyle KM, Russell DL, Sriraman V, Richards JS. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 2004;**18**(10):2463-78. [PMID: 15256533](#) [DOI: 10.1210/me.2003-0380](#)
24. Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem.* 2003;**278**(43):42330-9. [PMID: 12907688](#) [DOI: 10.1074/jbc.M300519200](#)
25. Espey LL, Yoshioka S, Russell DL, Robker RL, Fujii S, Richards JS. Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod.* 2000;**62**(4):1090-5. [PMID: 10727282](#)
26. Freimann S, Ben-Ami I, Dantes A, Armon L, Ya'cov-Klein AB, Ron-El R, et al. Differential expression of genes coding for EGF-like factors and ADAMTS1 following gonadotropin stimulation in normal and transformed human granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;**333**(3):935-43. [PMID: 15967414](#) [DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.177](#)
27. Madan P, Bridges PJ, Komar CM, Beristain AG, Rajamahendran R, Fortune JE, et al. Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle. *Biol Reprod.* 2003;**69**(5):1506-14. [PMID: 12855604](#) [DOI: 10.1095/biolreprod.102.013714](#)
28. Boerboom D, Russell DL, Richards JS, Sirois J. Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles. *J Mol Endocrinol.* 2003;**31**(3):473-85. [PMID: 14664708](#)
29. Schuster J, Karlsson T, Karlstrom PO, Poromaa IS, Dahl N. Downregulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in peripheral nucleated blood cells associated with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;**8**:58. [PMID: 20537145](#) [DOI: 10.1186/1477-7827-8-58](#)
30. Wu Y, Wu J, Lee DY, Yee A, Cao L, Zhang Y, et al. Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol.* 2005;**24**(1):3-13. [PMID: 15748997](#) [DOI: 10.1016/j.matbio.2004.11.007](#)