تغییرات بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ در سلول‌های کومولوس تخمدان زنان نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (کاندید IVF) و تأثیر کلونیدین بر آن

دکتر فریده ظفری زنگنه[1*]، الهه ابوترابی[2]، دکتر معصومه دهقان[3]، سارا ذبیح‌زاده[4]

۱. دانشیار مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج)، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. دانشجوی دکترای ژنتیک، مرکز علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. دکترای تولید مثل، مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج)، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴. دانشجوی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۵/۰۵

خلاصه

مقدمه: عملکرد تخمدان توسط پیام یا سیگنال‌های عصبی- هورمونی به‌طور همزمان باید رشد فولیکولی، ترشح استروئید و اوولاسیون را کنترل نماید. گیرنده‌های آلفا و بتای سیستم سمپاتیک در تنظیم فعالیت سلول‌های تکا و گرانولوزا جهت فولیکوژنزیس و استروئیدوژنزیس نقش دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات بیان ژن‌های سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ در سلول‌های کومولوس تخمدان زنان نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (کاندید IVF) و تأثیر کلونیدین بر آن انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۶ بر روی دو گروه کنترل (زنان سالم اهداء کننده تخمک) و مطالعه (مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک) انجام شد. تجویز داروهای محرک تخمک‌گذاری در دو گروه جهت رشد تخمک تجویز شد. بعد از گرفتن تخمک یا عمل پانکچر، از مایع فولیکولی مجموعه کومولوس و تخمک جمع‌آوری شد و سلول‌های کومولوس توسط آنزیم جدا و کشت داده شدند. سپس استخراج RNA از سلول‌های کومولوس انجام و غلظت RNA مورد نظر با دستگاه Nano drop خوانده شد. cDNA سنتز و برای ژن‌های ADRB2 و ADRα1,2 پرایمر طراحی و بیان ژن توسط تکنیک Real-time PCR سنجیده شد. در نهایت اثر داروی کلونیدین در سطح پروتئین ژن‌های ADRβ2 و ADRα1,2 در سلول‌های کومولوس دو گروه توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی (روش وسترن بلات) بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه افزایش سطح بیان ژن در زنان مبتلا به تخمدان پلی کیستیک نسبت به گروه کنترل و تأثیرگذاری کلونیدین بر بیان ژن را تأیید کرد. شدت این تأثیرگذاری بر بیان ژن گیرنده‌ها به‌ترتیب ADRα2 < ADRα1 < ADRβ2 بود ($p<۰/۰۲$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بیان ژن و ایمونوسیتوشیمی، کلونیدین توانست بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک به‌ویژه آلفادو را به‌طور معنی‌داری در بیماران کاهش دهد، لذا می‌توان درمان فارماکوتراپی کلونیدین را پیشنهاد نمود.

کلمات کلیدی: ایمونوسیتوشیمی، بیان ژن، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سیستم عصبی سمپاتیک، کلونیدین

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر فریده ظفری زنگنه؛ دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. **تلفن:** ۶۶۵۸۱۶۱۶-۰۲۱؛ **پست الکترونیک:** Zangeneh14@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ناباروری نه تنها به‌عنوان یک بیماری، بلکه به‌عنوان یک مسئله جدی تأثیرگذار بر زندگی خانوادگی، می‌تواند به بهداشت خانوادگی جامعه نیز صدماتی وارد کند. در حدود ۴۰-۳۰٪ از علل ناباروری زنان مربوط به اختلال عملکرد تخمدان است که از شایع‌ترین علل اختلال در سیستم تولید مثل زنان، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)[1] با میزان شیوع ۱۸-۴٪ می‌باشد (۱). عدم تخمک‌گذاری تقریباً عامل ۴۰٪ نازایی زنان است که بسیاری از این زنان، مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک می‌باشند (۲). امروزه مشخص شده است که عملکرد تخمدان توسط پیام یا سیگنال‌های عصبی- هورمونی خارج و داخل تخمدانی به‌طور همزمان، باعث کنترل رشد فولیکولی، ترشح استروئید و اوولاسیون در تخمدان می‌شود (۳). یافته‌های چند سال اخیر، نقش سیستم سمپاتیک تخمدانی را در رشد فولیکول و روند استروئیدوژنزیس تخمدانی کاملاً مؤثر گزارش کرده‌اند (۴، ۵). مطالعات مدل حیوانی نیز نقش سمپاتیک محیطی را پیشنهاد می‌کنند که فعالیت بالای این سیستم عصبی می‌تواند در سبب‌شناسی یا اتیولوژی و همچنین در روند پیشرفت سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نقش مؤثری داشته باشد (۶، ۷). تظاهرات این بیماری در دوران کودکی (بلوغ زودرس)، نوجوانی (هیرسوتیسم و اختلال سیکل)، بعد از بلوغ (ناباروری، عدم تحمل به گلوکز) و در دوران میانسالی (دیابت ملیتوس و اختلالات قلبی عروقی) رخ می‌دهد (۸). یافته‌های چند سال اخیر نشان می‌دهد که سیستم سمپاتیک تخمدانی در رشد فولیکول و روند استروئیدوژنز تخمدانی نقش کاملاً مؤثری دارد (۹). سابقه علمی بیماری تخمدان پلی‌کیستیک نشان می‌دهد که بیشترین گزارشات در مورد خطر یا وقوع بیماری‌های بعد از ابتلاء به تخمدان پلی‌کیستیک از جمله: دیابت ملیتوس، بیماری‌های قلبی - عروقی (خطر افزایش فشارخون و انفارکتوس میوکارد)، دیس لیپیدمی، کارسینوما (آندومتر، پستان و تخمدان) و وقفه تنفسی در حین خواب است که همگی با سیستم سمپاتیک در ارتباط مستقیم می‌باشند. برای مثال گیرنده‌های آلفا در بیماری‌هایی مانند فشارخون، مشکلات قلبی - عروقی و نقض در عملکرد انسولین وابسته به افزایش فعالیت سمپاتیک، نقش چشمگیرتری دارند (۱۲-۱۰). آداشی و همکاران (۱۹۸۱) حضور و نقش گیرنده‌های بتادو را در سلول‌های گرانولوزا بدین‌صورت گزارش نمودند که افزایش هورمون محرک فولیکول در دو محیط invivo و invitro سبب افزایش پاسخ گیرنده بتا در سلول‌های گرانولوزا می‌شود (۱۳). هرناندز و همکاران (۱۹۸۸) نقش گیرنده مذکور را در تنظیم بیوسنتز آندروژن تخمدانی در سلول‌های تکا گزارش دادند (۱۴).

در مطالعه حاضر سلول کومولوس برای کشت و در معرض دارو قرار دادن انتخاب شد؛ چراکه سلول کومولوس اووسفروس طی رشد فولیکولی از طریق برقراری ارتباط دوطرفه با تخمک، سبب تنظیم بلوغ تخمک می‌گردد. کومولوس‌ها زیرگروهی از سلول‌های گرانولوزا هستند که اووسیت را درون فولیکول آنترال احاطه کرده و نقش مهمی در بلوغ اووسیت دارند (۱۵). این راه ارتباطی توسط اتصالات شکافی برقرار می‌شود که یک ارتباط دوطرفه می‌باشد (۱۶). این سلول‌ها در هماهنگی رشد فولیکول (بلوغ اووسیت)، تولید انرژی برای تکمیل تقسیم میوز در اووسیت، تحریک بلوغ مولکولی اووسیت و هسته آن، تنظیم رونویسی در اووسیت، تحریک انتقال آمینواسید و بیوسنتز استرول، توسعه گلیکولیز و محافظت از اووسیت نقش دارند (۱۷). قابل ذکر است که پس از تخمک‌گذاری نیز سلول‌های کومولوس ارتباط خود را با اووسیت به‌صورت کمپلکس اووسیت- کومولوس حفظ می کند تا در دام مژه‌های لایه اپی‌تلیوم لوله رحمی بیفتد که این امر، موجب تسهیل انتقال تخمک به لوله رحمی می‌شود (۱۸). میزان آپوپتوز یا خودکشی سلولی در کومولوس اووسیت‌هایی که از نظر مورفولوژیکی غیرطبیعی هستند، بیشتر از اووسیت‌های نرمال است که می‌تواند بیانگر ارتباط نزدیک کولوس با تخمک باشد (۱۹).

کلونیدین هیدروکلراید، یک آگونیست آلفا ۲ پیش‌سیناپسی مرکزی است که در واقع نقش آنتی‌آدرنرژیک مرکزی را بازی می‌نماید؛ چراکه با مهار

[1] polycystic ovary syndrome

Archive of SID

www.SID.ir

گیرنده‌های آلفا ۲ پیش‌سیناپس آدرنرژیک، سبب کاهش فعالیت سیستم سمپاتیک می‌گردد. گیرنده آلفا ۲ در صورتی‌که در ناحیه پره یا پیش‌سیناپسی تحریک شود، سبب کاهش ریلیز یا رهایش کاته کولامین‌ها (نوروترانس میترهای آدرنرژیک) می‌شود، بنابراین نقش اتورسپتور یا مهارکننده دارد و از نظر فارماکودینامیک، کلونیدین از مؤثرترین آنتاگونیست‌های مرکزی در عملکرد سیستم سمپاتیک می‌باشد. باید توجه داشت در مجموع داروهای آنتی‌آدرنرژیک مرکزی موجب مهار رهایش کاتکولامین‌ها می‌گردند.

کلونیدین هیدروکلراید، اولین بار در سال ۱۹۷۴ با نام تجارتی کاتاپرس توسط سازمان غذا و داروی آمریکا تأیید و وارد بازار دارویی شد. این دارو بیش از ۴۰ سال است که مصرف داشته و طیف عملکرد وسیع آن به‌علت خاصیت آنتی‌آدرنرژیک بودن مرکزی آن است (۲۰). در مطالعه حاضر کلونیدین به‌خاطر اثرات مرکزی و محیطی آن بر سیستم عصبی سمپاتیک، داروی انتخابی بود؛ چراکه کلونیدین با خاصیت تسکینی می‌تواند آرام‌بخش مرکزی برای استرس و اضطراب زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک باشد (۲۱). کلونیدین در در درمان اعتیاد، کودکان هایپراکتیو و به‌عنوان کمک داروی بیهوشی اطفال در اتاق عمل کاربرد شایانی دارد، لذا می‌تواند اثرات سایکولوژیک بیماران مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک را که معمولاً پراسترس و مضطرب‌اند و خواب شبانه خوبی ندارند را بهبود ببخشد (۲۴-۲۲).

مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات بیان ژن‌های سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ در سلول‌های کومولوس تخمدان زنان نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (کاندید IVF) و تأثیر کلونیدین بر آن انجام شد.

روش‌کار

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۶ بر روی دو گروه کنترل (زنان سالم اهداءکننده تخمک) و مطالعه (مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک) در درمانگاه نازایی بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. گروه مطالعه بعد از تشخیص بیماری بر اساس کرایتریا یا معیار رتردام سال ۲۰۰۳ وارد مطالعه شدند و گروه کنترل زنانی بودند که اهدای تخمک داشتند. معیارهای ورود دو گروه شامل: ابتلاء به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و کاندید IVF، محدوده سنی ۴۰-۲۰ سال و شاخص توده بدنی زیر ۲۸ کیلوگرم بر متر مربع بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل: عدم ابتلاء به بیماری دیگر و عدم مصرف داروی دیگر (به‌جز داروهای محرک تخمک گذاری) بود. ۳ میلی‌لیتر خون محیطی از افراد گروه مطالعه و کنترل جهت انجام آزمایشات بیوشیمی جمع‌آوری و فریز شد تا آزمایشات هورمونی TSH، AMH، FSH، PR و LH انجام شود. کیت الایزای به‌کار رفته از شرکت Diametra ایتالیا می‌باشد.

سپس داروهای محرک تخمک‌گذاری با پروتکل دارویی آنتاگونیسم در دو گروه مطالعه و کنترل جهت رشد تخمک تجویز شد. سپس از مایع فولیکولی، مجموعه کومولوس و تخمک جمع‌آوری شده و سلول‌های کومولوس توسط آنزیم جدا شدند.

تهیه محیط کشت: سلول‌های کومولوس در محیط کشت DMEM[1] و FBS (سرم جنین گاوی به‌عنوان فاکتور رشد) ۱۰٪ در پلیت ۳ سانتی‌متری که کف پلیت دارای پوششی از ژلاتین ۰/۲-۰/۱ سانتی‌متر مربع/میلی‌گرم از شرکت سیگما (Cat. No.G1393، Gelatin Solution 2%) بود، در دمای ۳۷ درجه و در معرض گاز دی‌اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، محیط کشت تعویض و پس از آن هر ۷۲ ساعت یک‌بار محیط کشت تعویض شد. زمانی که ۸۰٪ سطح فلاسک توسط سلول‌ها پوشانده شد، توسط تریپسین ۰/۲٪ و لیگاند شش دندانه‌ای و عامل کلاته‌کننده (EDTA) سلول‌ها به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند. قابل ذکر است که در این مطالعه برای فریز کردن تخمک، کومولوس توسط آنزیم جدا و دور ریخته می‌شود، لذا نیازی به تهیه رضایت‌نامه از دو گروه نبود.

استخراج و سنجش RNA: بعد از اتمام مراحل کشت، استخراج RNA از سلول‌های کومولوس انجام و غلظت RNA مورد نظر با دستگاه Nano drop خوانده شد. معمولاً در مرحله بعد از این، مولکول‌های

[1] Dulbecco's Modified Eagle Medium

Archive of SID

www.SID.ir

RNA استفاده شده و با بهره‌گیری از آنزیم Reverse Transcriptase مولکول cDNA (کتابخانه cDNA) ساخته می‌شود. در این تحقیق از کیت AccuPower® RocketScript™ RT PreMix شرکت Bioneer استفاده شد که شامل آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس، DNTPs، Reaction buffer، رندوم پرایمر و ثابت کننده دما برای رونویسی معکوس است. از مزایای این کیت سرعت، پایداری، قابلیت تکثیر و سادگی می‌باشد. سپس cDNA سنتز و برای ژن‌های ADRB2 و ADRα1, 2 پرایمر طراحی و بیان ژن توسط تکنیک Real-time PCR سنجیده شد. بررسی سطح پروتئین ژن‌های ADRβ2 و ADRα1, 2 در سلول‌های کومولوس افراد سالم و زنان مبتلا به PCO توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی به روش وسترن بلات انجام شد.

بررسی سطح پروتئین: وسترن بلات (پروتئین بلات، ایمونوبلات) روشی نیرومند برای آشکارسازی پروتئین‌ها پس از الکتروفورز می‌باشد که به‌ویژه در مورد پروتئین‌های با غلظت پایین مناسب است. ایمونوبلاتینگ یا وسترن بلاتینگ روشی دو مرحله‌ای است که طی آن ابتدا باندهای پروتئینی جدا شده به‌وسیلهٔ الکتروفورز از روی ژل SDS-PAGE به غشای دیگری که غالباً از جنس نیتروسلولز می‌باشد، انتقال می‌یابند و در مرحله دوم توسط آنتی‌بادی اختصاصی، پروتئین مورد نظر شناسایی می‌شود. در این مطالعه از سه آنتی‌بادی اختصاصی گیرنده‌های آدرنرژیک استفاده شد. روش وسترن بلاتی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت روش Laemmli و Towbin است که در آن جهت شناسایی دوزهای پایین پروتئین تغییراتی اعمال شده است. سپس تصاویر بلات مربوط به وسترن بلات پروتئین‌های ADRa2, ADRB2 و Beta actin تهیه شد. قابل ذکر است که بتا اکتین به عنوان پروتئین خانه پا و کنترل آزمایش در نظر گرفته شده است.

تهیه دارو: در تهیه محلول داروی کلونیدین، با در نظر گرفتن پارامترهای فارماکوکینتیکی کلونیدین، چنانچه این دارو با دوزاژ ۰/۱ میلی‌گرم روزی ۲ بار به بیماران تجویز شود، بعد از رسیدن به حالت پایدار، غلظت آن در پلاسما بین ۰/۸-۰/۲ میلی‌لیتر/نانوگرم در نوسان خواهد بود. از آنجایی که در راهنماهای مطالعات پیش بالینی توصیه می‌شود که در مطالعات in vitro از غلظت‌های ایجاد شده در بالین بیمار بعد از رسیدن به حالت پایدار استفاده گردد، لذا در این مطالعه میانگین دوز ۰/۵ میلی‌لیتر/نانوگرم محلول در محلول نمکِ فسفات با خاصیت بافری (PBS) برای گروه‌هایی که به‌عنوان گروه کلونیدین در نظر گرفته شدند، در محیط کشت سلول‌های کومولوس استفاده شد.

در روش محاسبه حجم نمونه، بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به‌عنوان گروه مطالعه و زنان اهداء کننده تخمک گروه کنترل بودند. در مجموع چهار گروه (دو گروه مطالعه و دو گروه کنترل) که هر گروه شامل کومولوس‌های کشت داده شده ۵ تخمک می‌شد، در بین بقیه تخمک‌ها مناسب بودند.

گروه ۱: سلول‌های کومولوس بیمار بدون دارو، گروه ۲: سلول‌های کومولوس بیمار با دارو، گروه ۳: سلول‌های کومولوس کنترل بدون دارو و گروه ۴: سلول‌های کومولوس کنترل با دارو

آنالیز اولیهٔ داده‌ها با بررسی منحنی تکثیر امکان‌پذیر است و با تنظیم خط آستانه و تعیین میزان سیکل آستانه (Ct) فراهم می‌شود. بیشتر نرم افزارها تعداد سیکل‌ها را روی محور x و لگاریتم میزان فلورسانس ΔRn را روی محور y نشان می‌دهند.

آنالیز کمی داده‌ها به دو صورت روش سنجش مطلق و روش سنجش نسبی امکان‌پذیر است.

در این تحقیق از روش سنجش نسبی استفاده شد. در این روش چند ژن به صورت تناسبی با هم مقایسه می‌شوند. در این روش تعداد دقیق ژن‌ها تعیین نمی‌شود، بلکه ژن مرجع (آندوژن یا خانه‌دار) مقایسه می‌شود و خود شامل چندین روش است که در این تحقیق از روش ΔΔCt استفاده شد. سپس آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار REST محاسبه گردید.

جهت آنالیز داده‌های حاصل از بیان ژن سه گروه گیرنده آدرنرژیک در دو گروه مطالعه از روش‌های ناپارامتری کروسکال- والیس، من‌ویتنی و بن- فرونی استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

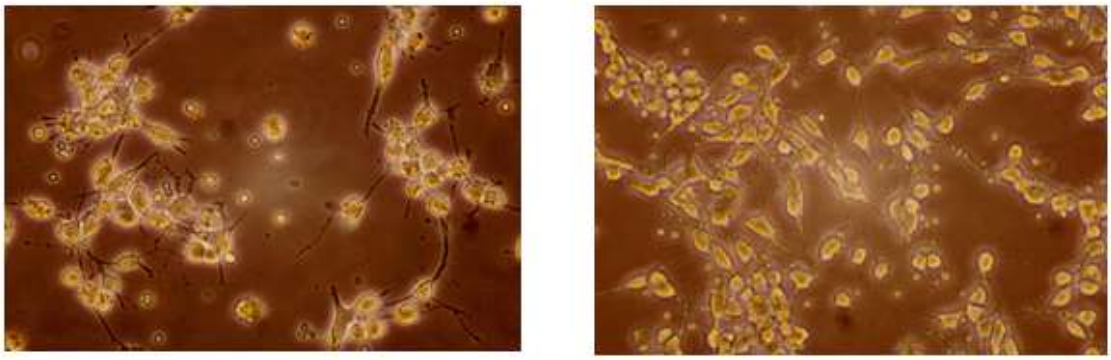
یافته‌ها

۱- یافته‌های مرفولوژیک سلولی

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۶ بر روی دو گروه کنترل (زنان سالم اهداء کننده تخمک) و مطالعه (مبتلایان به تخمدان پلی‌کیستیک) در درمانگاه نازایی بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. سلول‌های کومولوس در هر دو گروه کنترل و بیمار پس از کشت اولیه و پاساژ (کم کردن تراکم سلول‌های ظرف کشت) اول، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. با توجه به زمان رشد سلول‌ها، ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه، سلول‌ها از چسبندگی سلولی مناسب و مرفولوژی سلول‌های کومولوس در حالت کشت سلولی برخوردار بودند. پس از ۸۰٪ پر شدن سطح پلیت و پاساژ سلول‌ها، سلول‌ها قدرت چسبندگی و تکثیر را حفظ کرده و قابلیت برنامه‌ریزی برای گروه‌بندی و تیمار با دارو را در روز پنجم نشان دادند. تصاویر زیر نمایانگر مرفولوژی سلول‌ها می‌باشد. همانگونه که در تصاویر مشهود است، مرفولوژی سلول‌ها به‌طور کلی در دو گروه یکسان بود، ولی تفاوت در کیفیت سلول‌ها مشهود است (شکل ۱ و ۲).

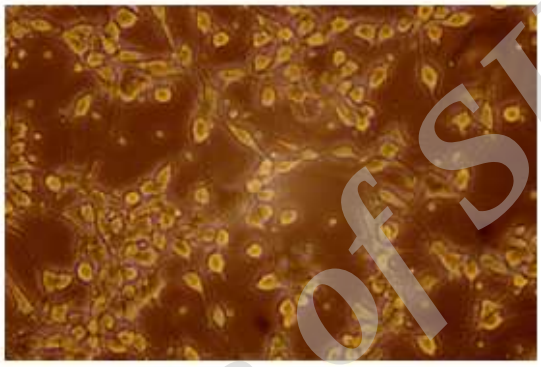
شکل ۱- تصاویر مرفولوژیک کشت سلول‌های کومولوس در گروه کنترل (زنان تخمک اهدایی)

Archive of SID
www.SID.ir



۷۲ ساعت بعد از کشت اولیه (روز سوم)

روز اول کشت اولیه



روز پنجم کشت کومولوس و آمادگی برای تجویز دارو

شکل۲- تصاویر مرفولوژیک کشت سلول‌های کومولوس در گروه مطالعه (زنان مبتلا به تخمدان پلی کیستیک)

بر اساس نتایج حاصل از آزمون ناپارامتری کروسکال-والیس در آنالیز بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک ADRβ2، ADRα1، ADRα 2 در سطح mRNA سلول‌های کومولوس، میانه بیان هر یک از ژن‌ها در چهار گروه یکسان نبود و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۲$) (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون کروسکال والیس برای مقایسه میانه حاصل از بیان ژن‌های سه گیرنده آدرنرژیکی بین چهار گروه اصلی

انواع گیرنده	سلول های کومولوس گروه کنترل	سلول های کومولوس گروه کنترل با دارو	سلول های کومولوس گروه مطالعه	سلول های کومولوس گروه مطالعه با دارو	سطح معنی داری
آدرنرژیک آلفا ۱	۱	۰/۹۱	۱/۸۰	۱/۲۴	۰/۰۲۷
آدرنرژیک آلفا ۲	۱	۰/۹۳	۱/۷۹	۱/۱۶	۰/۰۲۲
آدرنرژیک بتا ۲	۱	۰/۹۹	۱/۸۰	۱/۱۶	۰/۰۲۲

نتایج حاصل از آزمون‌های ناپارامتری من‌ویتنی برای مقایسه اندازه هر یک از ژن‌ها در گروه‌های دوگانه درمان و گروه‌های بدون درمان متناظرشان، هیچ اختلاف معناداری بین گروه‌ها نشان نداد.

برای بررسی بیشتر از آزمون‌های تعقیبی بن‌فرونی استفاده شد. بیان ژن در دو گروه Cumulus cells-treatment و PCOS اختلاف معناداری نشان داد که نتایج به شرح زیر است: بیان ژن گیرنده آلفا ۱ بین کومولوس‌های گروه PCOS بدون دارو و Cumulus

Archive of SID

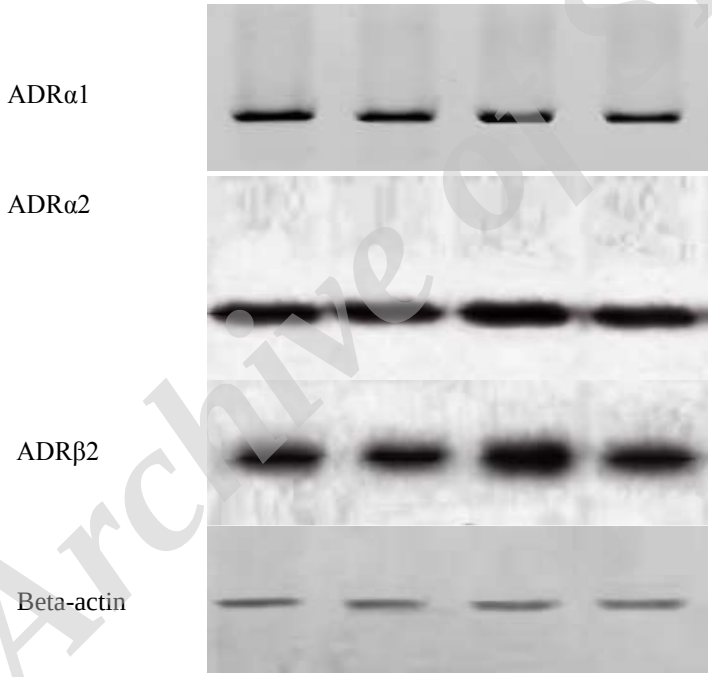
www.SID.ir

cells-treatment اختلاف معناداری داشت. (p=۰/۰۴۸)

بیان ژن گیرنده آلفا ۲ بین کومولوس‌های دو گروه PCOS بدون دارو و Cumulus cells-treatment اختلاف معناداری داشت (p=۰/۰۳۷). بیان ژن گیرنده بتا ۲ بین کومولوس‌های دو گروه PCOS بدون دارو و Cumulus cells-treatment اختلاف معنادار داشت (p=۰/۰۳۷). با آزمون همبستگی پیرسون به بررسی ارتباط خطی بین مقادیر ژن‌ها، بدون در نظر گرفتن گروه، پرداخته شد که نتایج حاصل حاکی از ارتباط مستقیم و قوی بین سه ژن مورد مطالعه (فارغ از گروه) بود.

Adrenoceptors	ADRα1	ADRα2	ADRβ2
ADRα1	R=۱	p<۰/۰۰۱ ،R=۰/۹۷۷	p<۰/۰۰۱ ،R=۰/۸۳۱
ADRα2		R=۱	
ADRβ2			R=۱

در روش ایمونوسیتوشیمی (وسترن بلات) آنالیز بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیکی در سطح پروتئین انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون تی تست و آزمون آنوای یک‌طرفه انجام گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد (شکل ۳).



شکل۳- تصاویر بلات مربوط به وسترن بلات پروتئین‌های ADRa1، ADRa2، ADRB2 و Beta actin: بتا اکتین به‌عنوان پروتئین خانه پا جهت کنترل آزمایش در نظر گرفته شده است.

نتایج بیان ژن‌ها در سطح mRNA نشان داد که گیرنده‌های سمپاتیک در سلول‌های کومولوس بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در سطوح بالاتری نسبت به گروه کنترل تولید می‌شوند که این یافته، نقش اصلی سیستم سمپاتیک و نقش پرکاری آن را در سطوح سلولی مولکولی در زنام مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تأیید می‌کند.

نتایج ایمونوسیتوشیمی بیان ژن‌ها در سطح تولید پروتئین در سلول‌های کومولوس نیز نتایج آزمون Real Time PCR را تأیید کرد. بیان ژن در سطح پروتئین،

Archive of SID
www.SID.ir

نمایانگر تبدیل mRNA به پروتئین می‌باشد، لذا افزایش سطح بیان ژن در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و هم‌چنین تأثیرگذاری داروی کلونیدین را می‌توان بر اساس این یافته تأیید کرد. در بین سه گیرنده، گیرنده ADR-α2 چه در سطح mRNA و چه در سطح پروتئین در گروه‌های درمانی کاهش بیشتری را نشان داد.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت کلونیدین یک ماده تأثیرگذار بر روی گیرنده‌های سمپاتیک سلول‌های کومولوس کشت داده است که شدت تأثیرگذاری آن بر روی گیرنده‌ها به‌ترتیب ADRα2 > ADRβ2 > ADRα1 می‌باشد.

بحث

در این مطالعه به بررسی میزان بیان ژن و سطح پروتئین سه گیرنده ADRα1، ADRα2 و ADRβ2 سیستم عصبی سمپاتیک در سلول‌های کومولوس بیماران مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک پرداخته شد. از آنجا که سیستم مذکور در این بیماری پرکار یا هایپر اکتیو می‌باشد، از کلونیدین (آگونیست آلفا ۲ پیش‌سیناپسی) به‌عنوان یک داروی آنتی‌آدرنرژیک مرکزی که سبب کاهش فعالیت سیستم سمپاتیک می‌شود، استفاده شد (۲۵، ۲۶). گزارش مونز و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که کلونیدین به‌عنوان یک آگونیست پیش‌سیناپسی آلفادو آدرنرژیک (اتو رسپتور)، یک اثر مهاری آلفا ۲-آدرنرژیکی بر روی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال (HPA)[1] دارد (۲۷). همچنین مطالعه پاسکوآلیس و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که تنظیم گیرنده مذکور جهت فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال در زنان چاق و غیرچاق، به‌ویژه در شرایط استرس متفاوت می‌باشد (۲۸). مطالعات داروی کلونیدین نشان می‌دهد که تنظیم تمایل هورمون‌ها بر گیرندهٔ آلفا-آدرنرژیک در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال توسط هورمون آزاد کننده کورتیکوتروفین (CRH)[2] تعدیل می‌شود (۲۹). در مطالعهٔ ظفری زنگنه و همکاران (۲۰۱۷) سطح سرمی هورمون آزاد کننده کورتیکوتروفین در زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با زنان سالم کاهش معنی‌داری داشت. کاهش هورمون آزاد کننده کورتیکوتروفین می‌تواند میزان تعدیل در فرآیند عملکرد رفتاری محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال را به‌هم زده و منجر به رفتار سایکولوژیک مانند اضطراب و افسردگی در زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک شود (۳۰). در مطالعه کارآزمایی بالینی ظفری‌زنگنه و همکاران (۲۰۱۱) که به‌دنبال مدل‌سازی تخمدان پلی‌کیستیک در رت انجام شد، کلونیدین سبب رفع کیست‌ها و پیدایش فولیکول بالغ در یافته‌های هیستولوژیک حاصل از تخمدان موش شد (۲۶، ۳۱). در مطالعه کارآزمایی بالینی ظفری‌زنگنه و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی تأثیر کلونیدین بر روی ۴۰ زن نابارور مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک پرداخته شد، رشد فولیکول و درصد بارداری توسط کلونیدین نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p<0/001$). مصرف کلونیدین همچنین سبب کاهش معنی‌دار بر سطوح سرمی نورآدرنالین و استرادیول در زنان گروه مطالعه شد (۳۲). از آنجایی که مطالعات نشان می‌دهند نورآدرنالین سبب رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی می‌شود، لذا مطالعات فارماکولوژیک با استفاده از آگونیست و آنتاگونیست‌های آدرنرژیک پیشنهاد می‌گردد. مطالعه ایتو و همکار (۲۰۰۵) نشان داد که گیرنده ADRβ2 توسط نورآدرنالین در ترشح پروژسترون از سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های لوتئال و همچنین از سلول‌های تکای بینابینی[3] جهت تحریک روند تولید آندروژن فعال می‌شود (۳۳). مطالعهٔ ظفری‌زنگنه و همکاران (۲۰۱۲) با به‌کارگیری آنتاگونیست بتادو (یوهیمبین) نشان داد که در موش مدل‌سازی شده، داروی یوهیمبین با آنتاگونیزه کردن سیستم عصبی سمپاتیک سبب کاهش معنی‌دار سطح سرمی استرادیول نسبت به موش‌های نرمال گردید که بیانگر نقش نورآدرنالین و گیرنده بتادو در روند استروئیدوژنزیس می‌باشد (۳۴).

سطوح بالایی از کاتکول‌آمین‌ها از جمله دوپامین نیز در بافت تخمدان شرح داده شده است. حتی گزارش شده

[1] Hypothalamus-pituitary-adrenal
[2] Corticotrophin-releasing hormone
[3] Theca-interstitial cells

Archive of SID

www.SID.ir

است که تخمک میمون ماکاکا[1] قادر به گرفتن دوپامین به‌عنوان پیشتاز سنتز نورآدرنالین بوده و به کمک آنزیم دوپامین β هیدروکسیلاز (DBH)[2] موجود در تخمک، قادر به سنتز یا ساخت نورآدرنالین می‌گردد. سپس نورآدرنالین سبب فعال کردن گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک تخمدان در سلول‌های گرانولوزای (GC)[3] فولیکول‌ها می‌شود. بنابراین دوپامین تخمدانی به‌عنوان پیشتاز، می‌تواند سبب ساخت یا سنتز نورآدرنالین در تخمک شود و به‌دنبال آن می‌تواند تولید و همچنین رهایش یا ریلیز استروئید و حتی القاء گیرنده‌های هورمون محرک فولیکول (FSHR)[4] را موجب شود (۳۵). مطالعه ظفری‌زنگنه و همکاران (۲۰۱۲) در مورد تخریب هستهٔ لکوس سرلئوس مغز موش نشان داد که در موش‌های مدل‌سازی شده تخمدان پلی‌کیستیک، میزان استرادیول سرم خون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۰۱$)، در حالی‌که در سطوح سرمی LH و FSH تغییری رخ نداد (۳۴). با توجه به این‌که هسته لکوس سرلئوس تنها هسته مغزی نورآدرنالینی می‌باشد که نقش تعدیلی در روند فرآیندهای فیزیولوژیک (از جمله نقش مهم آن در استرس) دارد، لذا با تخریب آن، روند استروئیدوژنزیس تخمدانی تحت‌الشعاع قرار گرفته و به علت عدم تعدیل با حذف کنترل مرکزی هسته لکوس، میزان سطح سرمی استرادیول رت افزایش می‌یابد.

از آن‌جایی که بلوغ اووسیت، یک پیش‌شرط لازم برای باروری تخمک است لذا کیفیت تخمک‌های حاصل از تحریک تخمدان کنترل شده (COS)[5] برای تکنولوژی تولید مثل بسیار قابل توجه می‌باشد. در طی رشد فولیکول، تخمک یا اووسیت اعضاء یا ارگانل‌های سیتوپلاسمی خود را به‌تدریج کامل کرده و mRNAها و پروتئین‌ها را تجمیع می‌کند تا قادر به باروری شده و ژن‌های جنینی بتوانند شروع به بیان کنند. حداکثر فعالیت رونویسی با کاهش اندازه تخمک کاهش می‌یابد و سپس تخمک بسته به RNAهای ذخیره شده برای عملکرد طبیعی خود در طی روندهای بلوغ، لقاح و رشد اولیه جنین، فعال می‌شود (۳۶، ۳۷). به‌طور کلی، یافته‌ها در این زمینه نشان می‌دهد که رویکردهای درمانی با هدف کاهش میزان فعالیت سمپاتیک به تخمدان می‌تواند در پیشگیری و درمان سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مفید باشد. برای مثال سلول‌های تکا و گرانولوزا بیانگر گیرنده‌های آلفا ۱ و ۲ و بتا ۲ آدرنرژیک هستند و فعال شدن آنها، به‌عنوان مثال سطح cAMP و تولید استروئید را تنظیم می‌نماید (۳۸). نورآدرنالین همچنین می‌تواند موجب رشد فولیکول‌های کوچک وابسته به هورمون محرک فولیکول[6] در موش نوزاد در شرایط آزمایشگاهی شود (۳۹). گرینر و همکاران (۲۰۰۵) در موش‌های مدل‌سازی شده تخمدان پلی‌کیستیک با قطع عصب سوپریور تخمدان که بیشترین عصب‌دهی آن از نوع اعصاب سمپاتیک است، افزایش بیان ژن گیرنده‌های بتا دو (ADRB-2) تخمدانی را نشان دادند. آنها مشاهده کردند که با گذشت زمان، سیکل استروس (مدت زمانی که در آن پستاندار ماده آماده باروری است) و تخمک‌گذاری در موش‌ها بازسازی می‌شود (۴۰). گزارش لونا و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان داد که ADRB-2 می‌تواند نقش فیزیولوژیک در تحریک رشد و تمایز سلول‌های تخمدانی داشته باشد. آنان با تجویز پره‌ترنول به‌عنوان آگونیست سیستم آدرنرژیک در موش توانستند رشد فولیکول و بیوسنتز آندروژن را القاء نمایند و سپس با آنتاگونیزه کردن سیستم مذکور توسط پروپرانولول مانع از روند فوق شدند (۴۱). مرز و همکاران (۲۰۱۵) نیز دقیقاً روند فوق را در میمون و انسان مطالعه کردند که نتایج آن تأییدی بر مطالعه لونا و همکاران بود (۴۲).

به‌طور کلی مطالعات چند دهه اخیر رویکرد درمان تخمدان پلی‌کیستیک را با هدف کاهش فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک تخمدانی پیشنهاد می‌کند که می‌تواند هم در پیشگیری و هم در درمان مؤثر باشد (۴۶-۴۳).

یافته‌های مطالعه حاضر که اولین گزارش از سطوح گیرنده‌های آدرنرزیک در سلول‌های کومولوس است، در بیان ژن گیرنده‌های آدرنرژیکی نشان داد که سطح

[1] Macaca mulatta
[2] dopamine β-hydroxylase
[3] granulosa cell
[4] Follicle stimulating hormone
[5] Controlled Ovarian Stimulation
[6] FSH-independent

Archive of SID

www.SID.ir

mRNA گیرنده‌های سمپاتیک در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در سطوح بالاتری نسبت به گروه نرمال تولید می‌گردد که این یافته نیز نقش پرکار شدن سیستم سمپاتیک در سطح سلولی مولکولی این بیماران را تأیید می‌نماید.

نتایج بررسی ایمونوسیتوشیمی در این مطالعه نیز با بررسی سطح تولید پروتئین، نتایج حاصله از آزمون Real Time PCR را تأیید کرد. بیان در سطح پروتئین نمایانگر تبدیل mRNA به پروتئین است، لذا بدین‌وسیله افزایش سطح بیان در سلول‌های کومولوس بیماران مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک تأیید و سپس تأثیرگذاری عملکرد آنتاگونیستی کلونیدین در کاهش آن نشان داده شد. نتایج گیرنده بتادو آدرنرژیک یافته‌های لونا و همکاران (۲۰۱۲) و مرز و همکاران (۲۰۱۵) (۴۱، ۴۲) را در دهه اخیر تأیید می‌نماید؛ چراکه ارتباط تنگاتنگ کومولوس با تخمک، بیانگر مؤثرترین راه ارتباط تغذیه‌ای با اووسیت می‌باشد که این ارتباط توسط ارتباطات شکافی میسر می‌گردد. لذا عدم کفایت آن می‌تواند در دو روند فیزیولوژیک مهم اووژنزیس و فولیکوژنزیس در تمام گونه‌های جانوری و انسان، اختلال ایجاد کند (۴۷). در بین این سه گیرنده، گیرنده ADRα2 در سطح mRNA و هم‌چنین در سطح پروتئین در گروه‌های درمانی کلونیدین نسبت به گروه کنترل، کاهش بیشتری رخ داد که این تأثیرگذاری بیانگر این واقعیت است که گیرنده مذکور می‌تواند هدف خوب فارماکولوژیک برای رشد فولیکول‌ها باشد که یافته‌های حیوانی و بالینی تحقیقات اخیر ما نیز تأییدی بر آن است (۲۶، ۳۲).

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت کلونیدین یک ماده تأثیرگذار بر روی گیرنده‌های سمپاتیک سلول کومولوس است که شدت این تأثیرگذاری بر روی گیرنده‌ها به‌ترتیب ADRα2 > ADRβ2 >ADRα1 می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بکارگیری کلونیدین در محیط کشت می‌تواند در روند درمان نازایی به‌روش تولید مثل کمکی (ART)[1] کمک نماید.

نتیجه‌گیری

امروزه فناوری کمک باروری در امر تولید مثل در دنیا پیشرفت‌های شایانی داشته است. هدف تحقیق حاضر دستیابی عمیق‌تر به اطلاعات روند سلولی- مولکولی گیرنده‌های آدرنرژیک و نقش آنها در سبب‌شناسی یا اتیولوژی پیچیده تخمدان پلی‌کیستیک به‌عنوان یک سندرم هتروژنوس یا ناهمگن و دیگری بهینه‌سازی درمان نازایی به‌روش تولید مثل کمکی با تأثیر بیشتر و قیمت ارزان‌تر می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق افزایش بیان ژن آدرنوسپتورها را در سلول‌های کومولوس که نزدیک‌ترین سلول‌ها به تخمک می‌باشند را تأیید نمود. کلونیدین به‌عنوان داروی قدیمی و شناخته شده آنتاگونیزه کننده سیستم عصبی آدرنرژیکی، با قیمتی نازال در محیط کشت توانست بیان ژن را در آدرنوسپتورهای کومولوس در فولیکول تخمدان پلی‌کیستیک کاهش دهد. این پیشنهاد مستلزم تحقیقات بیشتری نیز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران در مرکز تحقیقات باروری ولیعصر (عج) بیمارستان امام خمینی با طرح شماره ۳۰۲۷۴ مصوّب سال ۱۳۹۵ انجام شد. بدین‌وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

[1] Assisted reproductive technology

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Moran LJ, Hutchison SK, Norman RJ, Teede HJ. Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev 2011; 7:CD007506.
2. Fleming R, Hopkinson ZE, Wallace AM, Greere IA, Sattar N. Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo- controlled trial. J Clinical Endocrinol Metab 2002; 87(2):569-74.
3. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. Endocrinology 2000; 141(3):1059-72.
4. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. Endocrinology 1990; 126(1):364-75.
5. Adashi EY, Hsueh AJ. Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. Endocrinology 1981; 108(6):2170-8.
6. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. Endocrinology 1991; 133(6):2690-5.
7. Zangeneh FZ, Abdollahi A, Tavassoli P, Naghizadeh MM. The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling. Arch Gynecol Obstet 2011; 284(3):651-7.
8. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. Fertil Steril 2002; 77(5):873-82.
9. Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007; 3(2):103-11.
10. Wang ET, Calderon-Margalit R, Cedars MI, Daviglus ML, Merkin SS, Schreiner PJ, et al. Polycystic ovary syndrome and risk for long-term diabetes and dyslipidemia. Obstet Gynecol 2011; 117(1):6-13.
11. Balen A. Polycystic ovary syndrome and cancer. Hum Reprod Update 2001; 7(6):522-5.
12. Nitsche K, Ehrmann DA. Obstructive sleep apnea and metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010; 24(5):717-30.
13. Adashi EY, Hsueh AJ. Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. Endocrinology 1981; 108(6):2170-8.
14. Hernandez ER, Jimenez JL, Payne DW, Adashi EY. Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via beta 2-adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. Endocrinology 1988; 122(4):1592-602.
15. 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.
16. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci 2004; 82-83:431-46.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Brayfield A. Clonidine. Martindale: the complete drug reference. London, UK: Pharmaceutical Press; 2014.
21. Jamadarkhana S, Gopal S. Clonidine in adults as a sedative agent in the intensive care unit. J Anaesthesiol Clin Pharmacol 2010; 26(4):439-45.
22. Ommi D, Teymourian H, Zali A, Ashrafi F, Jabbary Moghaddam M, Mirkheshti A. Effects of clonidine premedication on intraoperative blood loss in patients with and without opium addiction during elective femoral fracture surgeries. Anesth Pain Med 2015; 5(4):e23626.
23. Sharma A, Couture J. A review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). Ann Pharmacother 2014; 48(2):209-25.
24. Moore AD, Anghelescu DL. Emergence delirium in pediatric anesthesia. Paediatr Drugs 2017; 19(1):11-20.
25. Lansdown A, Rees DA. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? Clin Endocrinol 2012; 77(6):791-801.
26. Zangeneh FZ. Mohammadi A, Ejtemaeimehr SH, Naghizadeh MM, Aminee F. The role of opioid system and its interaction with sympathetic nervous system in the processing of polycystic ovary syndrome modeling in rat. Arch Gynecol Obstet 2011; 283(4):885-92.
27. Muñóz-Hoyos A, Fernández-García JM, Molina-Carballo A, Macías M, Escames G, Ruiz-Cosano C, et al. Effect of clonidine on plasma ACTH, cortisol and melatonin in children. J Pineal Res 2000; 29(1):48-53.
28. Pasquali R, Vicennati V, Calzoni F, Gnudi U, Gambineri A, Ceroni L. Alpha2-adrenoceptor regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in obesity. Clin Endocrinol 2000; 52(4):413-21.
29. Coplan JD, Smith EL, Trost RC, Scharf BF, Altemus M, Bjornson L. Growth hormone response to clonidine in adversely reared young adult primates: relationship to serial cerebrospinal fluid corticotrophin-releasing factor concentrations. Psychiatry Res 2000; 95(2):93-102.
30. Zangeneh FZ, Naghizadeh MM, Bagheri M, Jafarabadi M. Are CRH & NGF as psychoneuroimmune regulatorsin women with polycystic ovary syndrome? Gynecol Endocrinol 2017; 33(3):227-33.

Archive of SID

www.SID.ir

31. Zangeneh FZ, Naghizadeh MM, Mineei BA, Aminee FA. PCOS & sympathetic outcome: role of the central and peripheral nervous system in ovarian function of rat. Asian J Pharm Clin Res 2012; 5(2):26-32.
32. Zafari Zangeneh F, Tehraninejad E, Naghizadeh MM, Mohebbi M. Effect of Alpha-2 adenoceptor inhibitors on the growth of ovarian follicles in patients with polycystic ovary syndrome. Tehran Univ Med J 2016; 73(10):709-16. (Persian).
33. Itoh M, Ishizuka B. Adrenergic receptor in rat ovary: presence and localization. Mol Cell Endocrinol 2005; 240(1-2):58-63.
34. Zangeneh FZ, Abdollahi A, Aminee F, Naghizadeh MM. Locus coeruleus lesions and PCOS: role of the central and peripheral sympathetic nervous system in the ovarian function of rat. Iran J Reprod Med 2012; 10(2):113-20.
35. Rey-Ares V, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A. Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. Reprod Biol Endocrinol 2007; 5:40.
36. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev 1995; 42(4):437-42.
37. Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. Hum Reprod Update 1998; 4(3):223-36.
38. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. Endocrinol 1982; 110(4):1124-32.
39. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. Endocrinology 1997; 138(8): 3320-9.
40. Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. Endocrine 2005; 28(3):319-24.
41. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. In vivo beta-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. Horm Metab Res 2012; 44(9):676-81.
42. Merz C, Saller S, Kunz L, Xu J, Yeoman RR, Ting AY, et al. Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles? J Ovarian Res 2015; 8:8.
43. Manni L, Holmäng A, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E. Ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. Auton Neurosci 2005; 118(1-2):79-87.
44. Zafari Zangeneh F, Abdollahi A, Aminee F, Naghizadeh MM. Locus coeruleus lesions and PCOS: role of the central and peripheral sympathetic nervous system in the ovarian function of rat. Iran J Reprod Med 2012; 10(2):113-20.
45. Li W, Chen Y, Xu L. Association of sympathetic nervous system activity with polycystic ovarian syndrome. Clin Exp Obstet Gynecol 2014; 41(5):499-506.
46. Bednarska S, Siejka A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? Adv Clin Exp Med 2017; 26(2):359-67.
47. Wang HX, Tong D, El-Gehani F, Tekpetey FR, Kidder GM. Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. J Cell Mol Med 2009; 13(5):972-84.

Archive of SID

www.SID.ir