

Research Paper

The Effects of L-dopa, SCH23390 Hydrochloride and Sulpiride on Adiponectin and Luteinizing Hormone Levels in an Animal Model of Polycystic Ovary Syndrome



Khadijeh Haghighat Gollo<sup>1</sup>, \*Fariba Mahmoudi<sup>1</sup>, Abolfazl Bayrami<sup>1</sup>, Saber Zahri<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.



**Citation:** Haghighat Gollo Kh, Mahmoudi F, Bayrami A, Zahri S. [The Effects of L-dopa, SCH23390 Hydrochloride and Sulpiride on Adiponectin and Luteinizing Hormone Levels in an Animal Model of Polycystic Ovary Syndrome (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(2):162-171. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5015.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5015.1>



Article Info:

Received: 03 Dec 2019

Accepted: 18 Feb 2020

Available Online: 01 Jun 2020

Key words:

L-dopa, Adiponectin, Polycystic ovary syndrome, Sulpiride, SCH23390

ABSTRACT

**Background and Aim** In patients suffer from Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), the secretion of the Luteinizing Hormone (LH) increases while adiponectin secretion and dopamine release decreases. Dopamine and adiponectin exert inhibitory effects on LH secretion. In the present study the effects of L-dopa and dopamine receptor antagonists were investigated on LH secretion and adiponectin gene expression in PCOS model rats to determine whether dopaminergic pathway might be involved in the decreasing LH via affecting adiponectin.

**Methods & Materials** Following estradiol valerate- induced PCOS, fifteen PCOS rats were divided into 3 groups including saline receiving group, L-dopa(100 mg/kg) or simultaneous injections of sulpiride(10 mg/kg), SCH23390 hydrochloride (1 mg/kg) and L-dopa(100 mg/kg), Five intact rats received saline as negative control group. Blood samples were collected via tail vein. Ovary and hypothalamus were dissected and frozen. Serum concentration of LH and relative gene expression of adiponectin in ovary and hypothalamus were determined by radioimmunoassay and real time-PCR method.

**Ethical Considerations** This study was approved by the Research Committee of University of Mohaghegh Ardabili (Code: 95.125.1).

**Results** Induction of PCOS caused a significant increase in mean serum concentration of LH and a significant decrease in mean relative gene expression of ovarian and hypothalamic adiponectin compared to control group. L-dopa caused a significant decrease in serum concentration of LH, a significant decrease in hypothalamic gene expression of adiponectin compared to PCOS rats. But it did not significantly increase ovarian adiponectin gene expression in comparison to PCOS rats. Dopamine receptor antagonists inhibit the effects of L-dopa on LH and hypothalamic gene expression of adiponectin.

**Conclusion** Dopaminergic signaling pathway may be involved in decreasing LH secretion via increasing hypothalamic adiponectin gene expression level in PCOS rats.

Extended Abstract

Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is associated with insulin resistance, elevated serum androgen levels, and an increase in the ratio of Luteinizing Hormone (LH) to Follicle-

Stimulating Hormone (FSH) [1, 2]. Adiponectin is synthesized in adipose tissue, hypothalamus, and gonads [3, 4]. Deficiency in adiponectin production leads to insulin resistance and disruption in lipid and glucose metabolisms [7, 8]. Serum adiponectin levels in PCOS women are lower than in healthy individuals [8, 10]. L-dopa is a precursor to the neurotransmitters dopamine, epinephrine and norepi-

\* Corresponding Author:

Fariba Mahmoud, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Tel: +98 (914) 4190422

E-mail: f.mahmoudi@uma.ac.ir

nephrine [14]. Dopamine and L-dopa inhibit Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) axis activity [15, 16]. PCOS is associated with decreased dopamine release [19]. This study aimed to examine the effects of L-dopa and dopamine receptor antagonists (SCH 23390 as D1 receptor and sulpiride as D2 receptor) on LH secretion and relative expression of adiponectin gene in the hypothalamus and ovaries of rats with PCOS induced by

### Materials and Methods

To perform this study, 20 Wistar female rats weighing 180-220 g were used. In order to induce PCOS, the animals received intramuscular injection of Estradiol Valerate (EV) in the estrous stage. 15 PCOS rats were divided into three groups of saline, L-dopa (100 mg/kg), and L-dopa + sulpiride + SCH 23390 (100 mg/kg L-dopa + 10mg/kg sulpiride + 1mg/kg SCH 23390 hydrochloride), and 5 healthy rats received saline as negative control group. In groups receiving antagonist and L-dopa, antagonists were injected 10 minutes before L-dopa injection. The hypo-

thalamus and ovarian samples were isolated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. The average serum LH concentration was measured using Radioimmunoassay (RIA). The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus was calculated using real-time PCR assay and delta-delta CT method ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  formula). The data obtained from this formula were analyzed in SPSS V. 16 software using one-way ANOVA test and the mean data were compared by using Tukey's post-hoc test. The results were presented as Mean $\pm$ SD, considering the significance level of  $P\leq 0.05$ .

### Results

The results of comparing the mean serum LH concentrations in the negative control and PCOS groups are shown in Table 1. The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of the PCOS control group showed a significant decrease compared to the negative control group ( $P=0.001$  for ovaries and  $P=0.015$  for hypothalamus) (Figure 1). For the PCOS group received L-do-

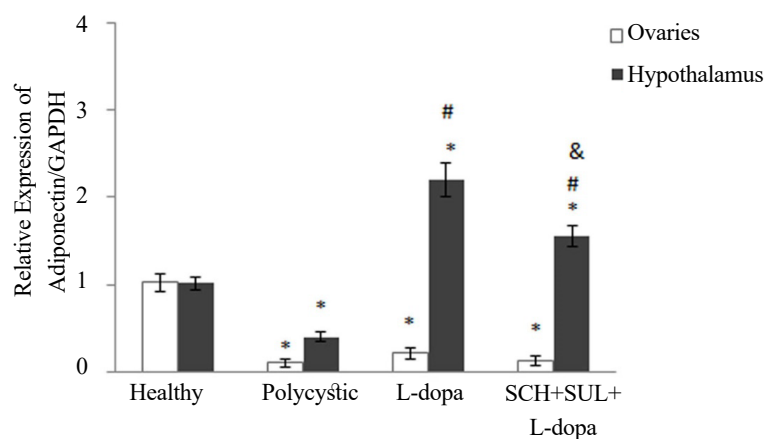
Table 1. Comparing the mean serum LH concentrations in the negative control and PCOS groups

Groups	ng/ml
Negative control	2.9 $\pm$ 0.14
PCOS control	5.08 $\pm$ 0.11 *( $P<0.001$ )
L-dopa	3.18 $\pm$ 0.26 **( $P<0.001$ )
L-dopa + sulpiride + SCH23390	3.95 $\pm$ 0.14 *( $P=0.003$ ), **( $P=0.002$ ), ***( $P=0.029$ )

\* Compared to the negative control group;

\*\* compared to the PCOS control group;

\*\* compared to the L-dopa group


 Journal of  
Arak University of Medical Sciences


 Journal of  
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of rats received saline, L-dopa only, and L-dopa plus sulpiride (SUL) and SCH 23390. \* Compared to the healthy group; # compared to the PCOS control; & compared to the L-dopa group

pa only, the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus increased non-significantly ( $P=0.924$ ) and significantly ( $P<0.001$ ), respectively (Figure 1). For the PCOS group received L-dopa, sulpiride, and SCH 23390 hydrochloride simultaneously, the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus decreased non-significantly ( $P=0.948$ ) and significantly ( $P=0.025$ ), respectively (Figure 1).

## Discussion

The results of the present study showed that in PCOS rats, serum LH concentrations increased significantly compared to the healthy rats, while the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of PCOS rats reduced significantly compared to the healthy rats. The results are consistent with previous research on the extent of adiponectin secretion in humans and rodents with PCOS. Previous studies have shown that the serum adiponectin level is reduced in women with PCOS compared to healthy peers, and PCOS obese women have lower serum levels than non-PCOS obese women [8, 22]. Decreased adiponectin levels in PCOS women may be due to increased production of androgens caused by reduced inhibitory effects of adiponectin on theca cells [23], because hyperandrogenism and obesity have been shown to play an important role in reducing plasma levels of adiponectin and causing insulin resistance, which is a major feature of PCOS [24, 25].

L-dopa exerted inhibitory effects on LH secretion and stimulatory effects on adiponectin gene expression in the hypothalamus of PCOS rats; however, it had no stimulatory effects on adiponectin gene expression in the ovaries of PCOS rats. This is consistent with the results of an in-vitro study where researchers examined the effects of dopamine on adipocyte cells incubated in culture, and reported the stimulatory effects of dopamine on adiponectin secretion from these cells [22]. Dopamine receptor antagonists including SCH23390 hydrochloride and sulpiride blocked the inhibitory effects of L-dopa on the LH secretion and its stimulatory effects on the relative expression of the adiponectin gene in the hypothalamus of PCOS rats. Increasing the activity of dopaminergic neurons may be effective in controlling endocrine disorders caused by decreased adiponectin secretion in PCOS patients.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study ethically approved in ethics committee of University of Mohaghegh Ardabili (Code: 95-125-1).

## Funding

The present paper was extracted from the MSc thesis of the first author, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili.

## Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

## Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Deputy of Research and Technology of the Mohaghegh Ardabili University for their financial and non-financial supports. Also thank to Dr. Homayoun Khaz'ali from Shahid Beheshti University for providing the instruments.

## اثرات ال دویا، SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید بر آدیپونکتین و هورمون لوتئینه کننده در مدل حیوانی در سندروم تخمدان پلی کیستیک

خدیجه حقیقت گلو<sup>۱</sup>، فریبا محمودی<sup>۱</sup>، ابوالفضل بایرامی<sup>۱</sup>، صابر زهری<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) ترشح هورمون لوتئینه کننده (LH) افزایش و ترشح آدیپونکتین و آزادسازی دوپامین کاهش می‌یابد. دوپامین و آدیپونکتین اثرات مهاری بر ترشح LH دارند. در تحقیق حاضر اثرات تزریق ال دویا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین بر ترشح LH و بیان ژن آدیپونکتین در موش‌های صحرایی PCOS بررسی شد تا مشخص شود که آیا ممکن است مسیر دوپامین‌رژیک از طریق تأثیر بر آدیپونکتین در کاهش LH دخیل باشد.

**مواد و روش‌ها:** بعد از ایجاد PCOS با تزریق استرادیول والرات، پانزده موش صحرایی PCOS به سه گروه شامل گروه‌های دریافت کننده سالین، ۱۰۰ mg/kg ال دویا یا تزریق هم‌زمان ۱۰ mg/kg سولپرید، ۱ mg/kg SCH23390 هیدروکلراید و ۱۰۰ mg/kg ال دویا تقسیم شدند. پنج موش صحرایی سالم به عنوان کنترل منفی، سالین را دریافت کردند. غلظت سرمی LH با روش رادیوایمنواسی و بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس با روش ریل تایم PCR اندازه‌گیری شد.

**ملاحظات اخلاقی:** این تحقیق در کمیته پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی (کد: ۱-۱۲۵-۹۵) تأیید شده است.

**یافته‌ها:** القای PCOS سبب افزایش معنی‌دار میانگین غلظت سرمی LH و کاهش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس در مقایسه با گروه کنترل شد. تزریق ال دویا سبب کاهش معنی‌دار غلظت سرمی LH و افزایش معنی‌دار بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس در مقایسه با گروه PCOS شد؛ ولی آن بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان را به طور معنی‌داری افزایش نداد. آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین اثرات ال دویا بر LH و بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس را مهار کردند.

**نتیجه‌گیری:** مسیر پیام‌رسانی دوپامین‌رژیک ممکن است تا حدودی از طریق افزایش بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس در کاهش ترشح LH در موش‌های صحرایی PCOS دخیل باشد.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۲ آذر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۹ بهمن ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۲ خرداد ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:

ال دویا، آدیپونکتین، سولپرید، PCOS، SCH23390

### زمینه و هدف

سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از مهم‌ترین عوامل اختلال در تخمک‌گذاری و ناباروری زنان است که با علائمی نظیر سیکل‌های قاعدگی نامنظم (الیگوامنوره) یا عدم تخمک‌گذاری (آمنوره)، افزایش سطوح سرمی آندروژن‌ها و افزایش نسبت هورمون لوتئینه‌کننده (LH) به هورمون محرک فولیکولی (FSH) همراه است [۱، ۲].

آدیپونکتین در بافت چربی، هیپوتالاموس، گنادها، عضلات اسکلتیپ و قلب سنتز می‌شود [۳، ۴]. آدیپونکتین اثرات فیزیولوژیکی خود را از طریق اتصال به دو گیرنده AdipoR1 و AdipoR2 اعمال می‌کند. گیرنده‌های آدیپونکتین در عضلات اسکلتی، قلب، کبد، مغز، سلول‌های بتا پانکراس، بیضه، سلول‌های

تکا و گرانولوزای تخمدان بیان می‌شوند [۳، ۴]. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سطوح پلاسمایی آدیپونکتین در افراد چاق، بیماران دیابتی و قلبی-عروقی پایین‌تر از افراد سالم است [۵]. نقص در تولید آدیپونکتین منجر به ایجاد مقاومت به انسولین، عدم تحمل گلوکز و اختلال در متابولیسم لیپیدها می‌شود [۷، ۸]؛ در حالی که آگونیست‌های گیرنده آدیپونکتین به عنوان داروی درمانی برای بیماری‌های مرتبط با چاقی نظیر دیابت و سندرم متابولیک عمل می‌کنند [۳]. هورمون آدیپونکتین ترشح GnRH/LH را با فعال کردن مسیر پروتئین کیناز فعال‌شونده cAMP (AMPK) مهار می‌کند [۹] و سطوح سرمی آدیپونکتین در زنان PCOS کمتر از افراد سالم است [۸، ۱۰].

ال دویا پیش‌ساز نوروترانسمیترهای دوپامین، اپی‌نفرین و

\*نویسنده مسئول:

فریبا محمودی

نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۴۱۹۰۴۲۲ (۹۱۴) ۹۸+

پست الکترونیکی: f.mahmoudi@uma.ac.ir

شدند. برای القای پلی کیستیک، تزریق عضلانی استرادیول والرات (پودر تهیه شده از شرکت ابوریحان، ایران) با دوز ۲ میلی گرم در ۰/۲ میلی لیتر روغن کنجد (شرکت باریج اسانس، ایران) در مرحله استروس انجام شد. موش‌ها به مدت ۶۰ روز در شرایط آزمایشگاهی با آب و غذای کافی قرار گرفتند. اسمیر واژنی برای بررسی القای PCOS صورت گرفت. از روز ۳۰ تثبیت حالت پلی کیستیک اتفاق افتاد و بر اساس بررسی‌های واژیناسیون و مشاهده مرحله استروس پایدار، القای PCOS تأیید شد.

تزریق داروها: برای انجام این آزمایش ۱۵ موش صحرایی PCOS به طور تصادفی به سه گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول سالین، گروه دوم ۱۰۰ mg/kg ال دوپا (شرکت سیگما، آمریکا) و گروه سوم تزریق هم‌زمان ۱ mg/kg SCH23390 هیدروکلراید (شرکت سیگما، آمریکا)، ۱۰ mg/kg سولپرید و ۱۰۰ mg/kg ال دوپا را در حجم ۰/۵ میلی لیتر از طریق تزریق داخل صفاقی در بازه زمانی ۹/۳۰-۹ صبح به مدت دو هفته دریافت کردند. پنج موش صحرایی که در مرحله استروس روغن کنجد را دریافت کرده بودند، بعد از ۶۰ روز به عنوان گروه کنترل منفی، تزریق داخل صفاقی سالین را دریافت کردند. قابل ذکر است که در گروه‌های دریافت کننده تزریق آنتاگونیست و ال دوپا، آنتاگونیست‌ها ۱۰ دقیقه قبل از ال دوپا تزریق شد. مقادیر ال دوپا و آنتاگونیست‌ها بر اساس تحقیقات پیشین انتخاب شده است [۲۰، ۲۱].

سنجش نمونه‌های سرمی: میانگین غلظت سرمی هورمون LH با استفاده روش رادیوایمنواسی (RIA) بر طبق دستورالعمل کیت سنجش هورمون LH ویژه موش صحرایی (Institute of Iso- (topes Co., Hungary) اندازه‌گیری شد.

جداسازی نمونه‌های بافتی: حیوانات با استفاده از کتامین (۸۰ mg/Kg BW) زایلین (۱۰ mg/Kg BW) بی‌هوش شدند. سر حیوانات جدا و مجمله آن شکافته شد و مغز بلافاصله خارج گردید. سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گرفت و برشی به ضخامت ۴ mm حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کیاسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی-تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه شد. هیپوتالاموس و نمونه‌های تخمدانی راست جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

بررسی میزان بیان ژنی با استفاده از روش ریل تایم-PCR: نمونه‌های هیپوتالاموسی و تخمدان با استفاده از (Bio pureZol (Rad Co, U.S.A) و دستگاه هوموژنایزر هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم (Merck Co, Germany)، ایزوپروپانول (Merck Co, Germany) و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت (Bio Rad Co, U.S.A) pureZol استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Sci-entific, U.S.A) تعیین شد. cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده یک میکروگرم RNA مطلق، ۱ میکرولیتر پرایمر الیگوتیمین (۴۰Mμ)،

نوراپی نفرین است که از اسید آمینه L- تیروزین توسط تیروزین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود. نام‌های تجاری آن pharmacopa و madopar است و از نظر کلینیکی در درمان بیماری‌های مرتبط با کاهش آزادسازی دوپامین استفاده می‌شود [۱۱-۱۴]. هنگام تزریق محیطی، دوپامین به علت عدم توانایی عبور از سد خونی مغزی نمی‌تواند مستقیماً روی دستگاه عصبی مرکزی اثر بگذارد، در حالی که پیش‌سازهای دوپامین (تیروزین یا ال دوپا) یا آگونیست‌های سنتتیک دوپامین نظیر SKF-38393 توانایی عبور از سد خونی مغزی را دارند [۱۴]. گیرنده‌های دوپامین روی ۵۰ درصد نورون‌های GnRH بیان می‌شوند. دوپامین و آگونیست‌های گیرنده‌های آن سبب مهار فعالیت هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناده‌ها (HPG) و کاهش آزادسازی GnRH/LH می‌شوند [۱۵، ۱۶]. همچنین نشان داده شده است که تخمدان انشعابات دوپامینی را دریافت می‌کند و گیرنده‌های دوپامین و آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در تخمدان و نواحی مختلف مغز بیان می‌شود [۱۷، ۱۸] و استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین سبب عدم تخمک‌گذاری و ایجاد مرحله استروس دائمی در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۷]. در افراد PCOS کاهش نسبی در میزان دوپامین مشاهده شده است که می‌تواند توضیحی برای افزایش ترشح GnRH و در نتیجه افزایش سطح سرمی LH در بیماران PCOS باشد [۱۹]. در تحقیق حاضر، اثرات تزریق داخل صفاقی ال دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی شامل SCH23390 هیدروکلراید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D<sub>۱</sub> و سولپرید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D<sub>۲</sub> بر ترشح هورمون LH و میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس و تخمدان در موش‌های صحرایی ماده مبتلا به PCOS القایی با استرادیول والرات بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

واحدهای آزمایشی: تحقیق حاضر از نوع تجربی بنیادی است. برای انجام این تحقیق، ۲۰ موش صحرایی ماده نژاد ویستار به وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم خریداری شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی استفاده شد. در تمامی مدت آزمایش، آب و غذای مخصوص موش صحرایی آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. دمای محل نگهداری حیوان در حد ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد بود و حیوانات همواره تحت شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بودند. شروع روشنایی ساعت ۷ صبح بود.

بررسی واژیناسیون و القای سندروم تخمدان پلی کیستیک: ابتدا موش‌ها به مدت دو هفته برای خو گرفتن به شرایط آزمایشگاه در قفس‌ها با آب و غذای کافی و دمای مناسب نگهداری شدند؛ سپس سیکل استروس آن‌ها به مدت دو هفته برای بررسی منظم بودن سیکل زیر نظر گرفته شد. پس از مشاهده دو دور سیکل استروس مرتب (به ترتیب پرو استروس، استروس، مت استروس و دی استروس) موش‌های صحرایی برای شروع آزمایش آماده

## نتایج

نتایج اثرات تزریق سالیین، ال‌دوپا یا تزریق هم‌زمان SCH23390 هیدروکلراید، سولپرید و ال‌دوپا بر میانگین غلظت سرمی LH در گروه کنترل منفی و گروه‌های PCOS در **جدول شماره ۱** خلاصه شده است.

میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس گروه PCOS نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌دار نشان داد ( $P=0/001$  برای تخمدان،  $P=0/015$  برای هیپوتالاموس) (تصویر شماره ۱). میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس گروه PCOS دریافت‌کننده ال‌دوپا نسبت به گروه PCOS به ترتیب افزایش بی‌معنی ( $P=0/924$ ) و افزایش معنی‌دار ( $P<0/001$ ) پیدا کرد (تصویر شماره ۱). در گروه تزریق هم‌زمان SCH23390 هیدروکلراید، سولپرید و ال‌دوپا میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس در مقایسه با گروه PCOS دریافت‌کننده ال‌دوپا به ترتیب کاهش بی‌معنی ( $P=0/948$ ) و کاهش معنی‌دار ( $P=0/025$ ) نشان داد (تصویر شماره ۱).

## بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در موش‌های صحرایی PCOS غلظت سرمی LH در مقایسه با گروه کنترل منفی از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS در مقایسه با گروه کنترل منفی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج حاصل منطبق بر تحقیقات پیشین درباره میزان ترشح آدیپونکتین در وضعیت PCOS در انسان و جوندگان است. تحقیقات پیشین نشان داده است که غلظت سرمی آدیپونکتین در زنان مبتلا به PCOS در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و زنان چاق PCOS در مقایسه با زنان چاق غیر پلی‌کیستیک، سطوح سرمی کمتری از آن را دارند [۲۲، ۸]. کاهش سطح آدیپونکتین در زنان PCOS ممکن است در نتیجه افزایش تولید آندروژن‌ها به دلیل کاهش اثرات مهاری آدیپونکتین روی سلول‌های تکا باشد [۲۳]؛ زیرا نشان داده شده

۱ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتید تری فسفات‌ها (10mM dNTP)، ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV (unit100) به همراه ۲ میکرولیتر بافر 10 X M-MuLV بر طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Vivantis Co., Malaysia) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد. تعیین سطح mRNA گلیسر آلدئید ۳ فسفو دهیدروژناز (GAPDH) توسط روش RT-PCR کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA آدیپونکتین استفاده شد.

پس از سنتز cDNA قطعات موردنظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت سایبرگرین ریل تایم پی‌سی‌آر شرکت تاکارا (Takara Bio Inc., Japan) و با استفاده از دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر روتر ژن مدل ۶۰۰۰ (Rotor Gene 6000, Corbett, Korea) تکثیر شدند. برنامه زمانی برای واکنش پی‌سی‌آر کمی شامل یک چرخه  $95^{\circ}\text{C}$  برای ۲ دقیقه و  $40$  چرخه  $95^{\circ}\text{C}$  برای ۵ ثانیه،  $60^{\circ}\text{C}$  برای ۲۵ ثانیه و  $60^{\circ}\text{C}$  برای ۲۰ ثانیه بود. پرایمرها از شرکت ژن فناوری ایران تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس GAPDH و آدیپونکتین به ترتیب برابر با GAPDH sense:  $5'-\text{AAGTTCAACGGCACAGTCAAG}-3'$  and GAPDH antisense:  $5'-\text{CATACTCAGCACCAGCATCAC}-3'$ ; adiponectin sense:  $5'-\text{AATCCTGCCAGTCATGAAG}-3'$  and adiponectin antisense:  $5'-\text{CATCTCCTGGGTCACCCCT}-3'$  TA است. محصولات GAPDH و آدیپونکتین حاصل به ترتیب ۱۲۰ و ۲۱۴ جفت باز هستند. داده‌های به دست آمده برای تعیین بیان نسبی ژن آدیپونکتین نسبت به GAPDH با روش دلتا دلتا سی تی طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  با استفاده از نرم‌افزار SSPS (Version ۱۶) و با استفاده از آزمون آنوای یک‌طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی انجام شد. نتایج حاصل به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین  $\pm$  SEM ارائه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شد. در تمام آنالیزهای آماری نتایج با  $P \leq 0/05$  معنی‌دار گزارش شدند.

جدول ۱. میانگین غلظت سرمی هورمون لوتئینه (LH)

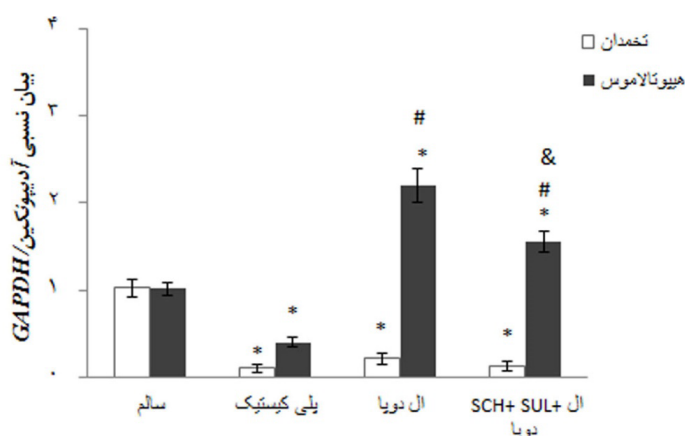
گروه‌ها	ng/ml
کنترل منفی	$2/9 \pm 0/14$
کنترل PCOS	$5/08 \pm 0/11$ ( $P < 0/001$ ) <sup>*</sup>
ال‌دوپا	$3/18 \pm 0/26$ ( $P < 0/001$ ) <sup>**</sup>
تزریق هم‌زمان ال‌دوپا، SCH23390 و سولپرید	$3/95 \pm 0/14$ ( $P = 0/003$ ) <sup>*</sup> , ( $P = 0/002$ ) <sup>**</sup> , ( $P = 0/029$ ) <sup>***</sup>

<sup>\*</sup> در مقایسه با گروه کنترل منفی

<sup>\*\*</sup> در مقایسه با PCOS

<sup>\*\*\*</sup> در مقایسه با گروه ال‌دوپا





تصویر ۱. میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین؛ \* در مقایسه با سالم؛ # در مقایسه با PCOS؛ & در مقایسه با ال دویا



می‌تواند سبب افزایش وزن و پرمویی شود [۲۶]. دوپامین کنترل‌کننده مهارى پرولاکتین است و تزریق دوپامین موجب سرکوب پرولاکتین در مردان و زنان سالم و همچنین بیماران هیپرپرولاکتینمی می‌شود [۲۲].

از طرفی نشان داده شده است که بین کاهش سطوح بیان آدیپونکتین و ایجاد مقاومت به انسولین ارتباط مستقیمی وجود دارد [۷، ۸] و افزایش پرولاکتین منجر به ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود [۲۷]؛ همچنین نیلسون و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که پرولاکتین ترشح آدیپونکتین را در بافت چربی انسان در شرایط *in vitro* و در جوندگان در شرایط *in vivo* به‌طور قابل توجهی مهار می‌کند [۲۶]. با در نظر گرفتن یافته‌های این تحقیقات می‌توان فرض کرد که کاهش سنتز پرولاکتین با تزریق ال دویا ممکن است یکی از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر بیان ژن آدیپونکتین در این تحقیق باشد.

با در نظر گرفتن اثر مهارى دوپامین بر آندروژن‌هایی مثل تستوسترون و استرادیول و با توجه به تحقیقات در زمینه تأثیر آندروژن‌ها بر غلظت آدیپونکتین سرم مشخص شده است که تزریق تستوسترون به مردان به‌طور مستقیم تولید آدیپونکتین را از بافت آدیپوسیت سرکوب می‌کند و نتایج نشان می‌دهد که آندروژن‌ها باعث کاهش آدیپونکتین پلازما می‌شود و هیپوآدیپونکتینمی ممکن است با خطرات احتمالی مقاومت به انسولین در مردان مرتبط باشد [۲۸، ۲۹]. پس کاهش آندروژن‌ها از طریق تزریق دوپامین می‌تواند یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر آدیپونکتین باشد. سطوح آدیپونکتین سرم به‌عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی و ضددیابتی دارای ارتباط نزدیک با مقاومت به انسولین است و مطالعات از یک ارتباط معکوس بین آدیپونکتین و مقاومت به انسولین بحث می‌کنند.

با توجه به اینکه مقاومت به انسولین یکی از مؤلفه‌های اصلی PCOS محسوب می‌شود، به نظر می‌رسد بررسی ارتباط آدیپونکتین و انسولین کمک شایانی به چگونگی اثرات تحریکی

است که هیپرآندروژنیسم و چاقی در کاهش سطوح پلاسمایی آدیپونکتین و ایجاد مقاومت به انسولین نقش مهمی ایفا می‌کنند که از مشخصه‌های اصلی PCOS است [۲۴، ۲۵].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق ال دویا سبب افزایش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس گروه PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل منفی می‌شود. تزریق ال دویا میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین را در تخمدان موش‌های صحرایی PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل منفی به‌طور معنی‌داری افزایش نداد. نتایج حاصل منطبق بر تنها تحقیق موجود در مورد اثرات دوپامین بر ترشح آدیپونکتین است که در آن محققان اثرات دوپامین بر سلول‌های آدیپوسیت انکوبه‌شده در محیط کشت در شرایط *in vitro* را بررسی و در نتیجه اثرات تحریکی دوپامین بر ترشح آدیپونکتین از این سلول‌ها را گزارش کردند [۲۲]. همچنین نتایج حاضر نشان داد که تزریق هم‌زمان هر دو نوع آنتاگونیست شامل SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید به‌بلوکه کردن اثرات تحریکی ال دویا بر میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS منجر می‌شود؛ درحالی‌که تزریق هم‌زمان هر دو نوع آنتاگونیست میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان را تحت تأثیر قرار نداد.

در مورد نقش مسیر دوپامین‌رژیک بر فعالیت مسیر عصبی آدیپونکتین اطلاعات زیادی در دسترس نیست و یافتن دقیق این مسیرها نیاز به تحقیقات آتی بیشتری دارد، ولی می‌توان بر اساس تحقیقات پیشین و در نظر گرفتن فاکتورهای اصلی دخیل در پاتوژنز PCOS نظیر هیپرآندروژنیسم، مقاومت به انسولین، افزایش ترشح پرولاکتین و غیره احتمال داد که مسیرهای عصبی واسطه‌ای مختلفی ممکن است در اعمال اثرات تحریکی ال دویا بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس نقش داشته باشد [۲۳-۳۱]. پرولاکتین با مهار ترشح GnRH موجب مهار ترشح پالسی گنادوتروپین‌ها می‌شود [۲۶]. پرولاکتین همچنین روند سنتز آندروژن‌های آدرنال را تحریک می‌کند. افزایش آندروژن‌ها

دوپامین بر ترشح آدیپونکتین در مدل‌های پلی‌کیستیک کند. انسولین به عنوان مهارکننده سطوح آدیپونکتین در انسان‌ها و حیوانات و تنظیم‌کننده ترشح آدیپونکتین شناخته شده است [۳۰]؛ همچنین نوعی ارتباط خطی منفی و معنی‌دار بین سطوح آدیپونکتین و گلوکز ناشتا مشاهده شده است. در این زمینه برگ و همکاران با استناد به یافته‌های خود اظهار داشتند که افزایش آدیپونکتین در سطوح پلاسمایی آدیپونکتین موجب کاهش سطوح گلوکز پلازما به واسطه مهار بیان آنزیم‌های گلوکونئوژنز کبدی در موش‌های دیابتی می‌شود [۳۱]؛ همچنین مطالعات پیشین اثرات مهاری انسولین بر آدیپونکتین را مطرح کرده‌اند [۳۰]؛ بنابراین کاهش ترشح انسولین توسط دوپامین را می‌توان مسیر واسطه مهم دیگری برای اثرات تحریکی مسیر دوپامینرژیک بر بیان ژن آدیپونکتین در نظر گرفت. با وجود این، برای یافتن نقش دقیق‌تر مسیر دوپامینرژیک در کنترل ترشح و بیان ژن آدیپونکتین پیشنهاد می‌شود که اثرات تزریق بطن سوم مغزی یا تزریق داخل هسته قوسی (ARC) یا ناحیه پریاپتیک میانی دوپامین، آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مختلف گیرنده دوپامین بر میانگین غلظت سرمی و بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس و بافت چربی یا اثرات دوپامین بر نوروپپتیدهای کنترل‌کننده سنتز آدیپونکتین نظیر گرلین، کیسپتین و غیره در موش‌های صحرایی PCOS بررسی شود.

### نتیجه‌گیری

القای PCOS در موش‌های صحرایی سبب افزایش غلظت سرمی LH و کاهش بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس شد. ال‌دوپا اثرات مهاری بر ترشح LH و اثرات تحریکی بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS اعمال کرد. ال‌دوپا اثرات تحریکی بر بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان موش‌های صحرایی PCOS نداشت. آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی شامل SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید اثرات مهاری ال‌دوپا بر ترشح LH و اثرات تحریکی آن بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS را بلوکه کرد. احتمال دارد که افزایش فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک در کنترل اختلالات اندوکروینی ناشی از کاهش ترشح آدیپونکتین در بیماران PCOS مؤثر واقع شود.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق را کمیته پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی (کد: ۱۲۵ - ۹۵) تأیید کرده است.

### حامی مالی

نتایج این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری سرکار خانم خدیجه حقیقت گلو است. نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنند.

### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تضاد منافی در این پژوهش وجود ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنند. همچنین نویسندگان از جناب آقای دکتر همایون خزعلی از دانشگاه شهید بهشتی برای تأمین دستگاه‌ها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.



## References

- [1] Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2017; 40(1):1-8. [DOI:10.1007/s40618-016-0523-8] [PMID] [PMCID]
- [2] Adgi Z, Talaei A, Mohamadi Kelishadi M. [The evaluation of the relationship between hirsutism and insulin resistance in patients with PCOS and idiopathic hirsutism (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2011; 14(2):51-7. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-953-en.html>
- [3] Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M, Szeszko k, Rytelawska E, Kisielevska K, et al. Adiponectin: A new regulator of female reproductive system. *Int J Endocrinol*. 2018; 2018:7965071. [DOI:10.1155/2018/7965071] [PMID] [PMCID]
- [4] Davoodi B, Zilaei Bouri Sh, Ahangarpour A, Zilaei Bouri M. [Effects of two different physical exercises on plasma levels of adiponectin and resistin in obese and overweight young girls (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2014; 17(4):27-37. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-2206-en.html>
- [5] Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, et al. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*. 2007; 148(1):401-10. [DOI:10.1210/en.2006-1019] [PMID]
- [6] Lee B, Shao J. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014; 15(2):149-56. [DOI:10.1007/s11154-013-9283-3] [PMID] [PMCID]
- [7] Groth SW. Adiponectin and polycystic ovary syndrome. *Biol Res Nurs*. 2010; 12(1):62-72. [DOI:10.1177/1099800410371824] [PMID] [PMCID]
- [8] Michalakis KG, Segars JH. The role of adiponectin in reproduction: From polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2010; 94(6):1949-57. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.05.010] [PMID] [PMCID]
- [9] Cheng XB, Wen JP, Yang J, Yang Y, Ning G, Li XY. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine*. 2011; 39(1):6-12. [DOI:10.1007/s12020-010-9375-8] [PMID]
- [10] Parillo F, Maranesi M, Mignini F, Marinelli L, Di Stefano A, Boiti C, et al. Evidence for a dopamine intrinsic direct role in the regulation of the ovary reproductive function: In vitro study on rabbit corpora lutea. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104797. [DOI:10.1371/journal.pone.0104797] [PMID] [PMCID]
- [11] Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends Neurosci*. 2007; 30(5):194-202. [DOI:10.1016/j.tins.2007.03.006] [PMID]
- [12] Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24(1):125-32. [DOI:10.1016/S0149-7634(99)00063-9]
- [13] Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloch S, et al. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology*. 2013; 154(2):807-18. [DOI:10.1210/en.2012-1759] [PMID]
- [14] Zarabian M, Salehipour F, Ostad SN. The study of dose-response mitogenic effect of L-dopa on the human periodontal ligament fibroblasts cell. *Acta Med Iran*. 2004; 42(5):363-6. <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/2752>
- [15] Liu X, Herbison AE. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology*. 2013; 154(1):340-50. [DOI:10.1210/en.2012-1602] [PMID]
- [16] Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, et al. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*. 2015; 50(3):783-96. [DOI:10.1007/s12020-015-0636-4] [PMID]
- [17] Chaudhari N, Dawalbhakta M, Nampoothiri L. GnRH dysregulation in Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018; 16(1):37. [DOI:10.1186/s12958-018-0354-x] [PMID] [PMCID]
- [18] Ayano G. Dopamine: Receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: Review of literatures. *J Ment Disord Treat*. 2016; 2(2):1000120. [DOI:10.4172/2471-271X.1000120]
- [19] Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, et al. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: Implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(8):2484-92. [DOI:10.1210/jc.2011-0075] [PMID]
- [20] Andersson K, Fuxe K, Eneroth P, Härfstrand A, Agnati LF. Involvement of D1 dopamine receptors in the nicotine-induced neuro-endocrine effects and depletion of diencephalic catecholamine stores in the male rat. *Neuroendocrinology*. 1988; 48(2):188-200. [DOI:10.1159/000125007] [PMID]
- [21] Grierson JP, James MD, Pearson JR, Wilson CA. The effect of selective D1 and D2 dopaminergic agents on sexual receptivity in the female rat. *Neuropharmacology*. 1988; 27(2):181-9. [DOI:10.1016/0028-3908(88)90169-4]
- [22] Borcherdig DC, Hugo ER, Idelman G, De Silva A, Richtand NW, Loftus J, et al. Dopamine receptors in human adipocytes: Expression and functions. *PloS One*. 2011; 6(9):e25537. [DOI:10.1371/journal.pone.0025537] [PMID] [PMCID]
- [23] 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(1-2):38-45. [DOI:10.1016/j.mce.2008.01.007] [PMID]
- [24] Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JJ, Álvarez-Blasco F, Sanchón R, Luque-Ramírez M, et al. Adiponectin and resistin in PCOS: A clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod*. 2006; 21(9):2257-65. [DOI:10.1093/humrep/del146] [PMID]
- [25] Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002; 51(9):2734-41. [DOI:10.2337/diabetes.51.9.2734] [PMID]
- [26] Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331(4):1120-6. [DOI:10.1016/j.bbrc.2005.04.026] [PMID]
- [27] Daimon M, Kamba A, Murakami H, Mizushiri S, Osonoi Sh, Yamaichi M, et al. Association between serum prolactin levels and insulin resistance in non-diabetic men. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175204. [DOI:10.1371/journal.pone.0175204] [PMID] [PMCID]
- [28] Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem*. 2005; 280(18):18073-80. [DOI:10.1074/jbc.M414231200] [PMID]
- [29] Page ST, Herbst KL, Amory JK, Coviello AD, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men. *J Androl*. 2005; 26(1):85-92. [DOI:10.1002/j.1939-4640.2005.tb02876.x]

- [30] Giahi L, Djazayeri A, Rahimy A, Rahmany M, Larijani B. Serum level of adiponectin and its association with insulin sensitivity in overweight diabetic and non-diabetic Iranian men. Iran J Public Health. 2008; 37(2):88-92. <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/2060>
- [31] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med. 2001; 7(8):947-53. [DOI:10.1038/90992] [PMID]