

یا حیّ یا قیّوم

قال رسول الله (ص): جستن علم بر هر مسلمانی واجب است و همه چیز حتی ماهی های دریا برای جویای علم آمرزش می طلبند (نهج الفصاحة ص ۳۱۳).



Journal of Receptors and Signal Transduction

Expression of ADR- α 1, 2 and ADR- β 2 in cumulus cell culture of infertile women with polycystic ovary syndrome and poor responder who are a candidate for IVF: the novel strategic role of clonidine in this expression

Farideh Zafari Zangeneh* Maryam Bagheri Maryam Sarmast
Shoushtari Mohammad Mehdi Naghizadeh

Journal of Receptors and Signal Transduction

بررسی بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ سلول های کومولوس تخمدان زنان نابارور پاسخ ضعیف یا پورسپاندر کاندید لقاح آزمایشگاهی

فریده ظفری زنگنه، دانشیار مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر، بیمارستان ولیعصر ۲،
دانشگاه علوم پزشکی تهران

محمد مهدی نقی زاده، مربی مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی
فسا، فسا، ایران

مریم باقری، دانشجوی دکترای بهداشت باروری، گروه بهداشت باروری، دانشکده پرستاری
ومامایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

معصومه دهقان، استادیار مرکز آی وی اف، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی
تهران

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خرداد ۱۳۹۹، دوره
۷۸، شماره ۳، صفحه های ۱۲۱ تا ۱۲۹

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

دکتر فریده ظفری زنگنه*؛ الهه ابوترابی؛ دکتر معصومه دهقان؛ سارا ذبیح زاده

مجله زنان مامایی و نازایی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
دوره ۲۲، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۸، صفحه ۱-۱۲

چکیده

مقدمه: عملکرد تخمدان توسط پیام یا سیگنال‌های عصبی-هورمونی به طور همزمان باید رشد فولیکولی، ترشح استروئید و اوولاسیون را کنترل نماید. گیرنده‌های آلفا و بتای سیستم سمیاتیکی در تنظیم فعالیت سلول‌های تکا و گرانولوزا جهت فولیکوژنریس و استروئیدوژنریس نقش تام دارند.

هدف تحقیق: بررسی تغییرات بیان ژن‌های سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ در سلول‌های کومولوس تخمدان زنان نابارور مبتلا (۱) به ضعف تخمدان (۲) تخمدان پلی‌کیستیک کاندید آی وی اف در محیط کشت و هم‌چنین تأثیر داروی کلونیدین بر آن انجام شد.

بروز واکنش تخمدان به تحریک در روند تکنولوژی یا فناوری کمک باروری در زنان POR بین ۲۴-۹ درصد می‌باشد که با افزایش سن زنان، شاخص توده بدنی و جراحی‌های صورت گرفته در تخمدان ارتباط تام دارد.

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 به ترتیب $ADR\alpha1 < ADR\beta2 < ADR\alpha2$ بود ($p < 0.02$).

نتیجه‌گیری:

بر اساس نتایج بیان ژن و ایمونوسیتوشیمی، کلونیدین توانست بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک به ویژه **آلفادو** را به‌طور معنی‌داری در بیماران کاهش دهد، لذا می‌توان درمان **فارماکو تراپی کلونیدین** را پیشنهاد نمود.

مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک با درجه شیوع ۱۸-۴۰٪ (۱) یک اختلال اندوکراین-متابولیکی ست که شایع ترین علت ناباروری با عدم تخمک گذاری و هیپراندرژنیسم در زنان می باشد. عدم تخمک گذاری تقریباً عامل ۴۰٪ نازایی زنان است. بسیاری از این زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک می باشند. با توجه به تحقیقات گسترده ای که در دنیا روی این بیماری صورت می گیرد هنوز اتیولوژی آن ناشناخته و علت آن همان پیچیدگی پاتوفیزیولوژی با اختلال عملکرد اندوکراین - متابولیک در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال می باشد که با پرکاری سیستم عصبی سمپاتیک همراهی می شود.

۱۸-۵٪ افرادی که در سیکل های IVF قرار می گیرند زانی هستند که به تحریک تخمدان پاسخ ضعیف می دهند. زنان با پاسخ ضعیف تخمدان یا پورر سپانس، گروهی از بیماران نابارور هستند که ذخیره تخمدان، پاسخ تخمدان به داروها و کیفیت تخمک ها در آنها کاهش یافته است. این افراد، در سیکل های متعدد درمانی قرار می گیرند و علی الرغم هزینه بالا و صرف وقت زیاد نتیجه تحریک تخمک گذاری در این افراد موفق نمی باشد.

روش بررسی: این مطالعه مورد - شاهدهی در سال ۱۳۹۶ بر روی دو گروه کنترل (زنان سالم اهداء کننده تخمک) و مطالعه (تخمدان پلی کیستیک با معیار تشخیصی ESHRE و تخمدان پاسخ ضعیف با معیار تشخیصی Bologna) انجام شد. با دامنه سنی ۲۰-۴۵ سال و اندکس توده بدنی زیر ۲۸ به عنوان ضوابط ورود و عدم مصرف هر گونه دارو بجز داروهای محرک تخمک گذاری که در دو گروه جهت رشد تخمک تجویز شد. بعد از گرفتن تخمک یا عمل پانکچر، از مایع فولیکولی مجموعه کومولوس و تخمک جمع آوری شد و سپس سلولهای کومولوس توسط آنزیم جدا و کشت داده شدند، شامل محیط کشت اولیه، سه روزه و پنج روزه.

پس از پانکچر فولیکول ها، کومولوس ها از کمپلکس تخمک-کومولوس جدا و با لام نئوبار شمارش و به محیط کشت اضافه شدند. در محیط کشت داروی کلونیدین نیز بر گروه کومولوس+ دارو اضافه شد. سلول های کومولوس سپس استخراج **RNA** انجام و غلظت **RNA** خوانده شد.

cDNA سنتز و برای ژن های **ADR α 1, 2** و **B2** پرایمر طراحی و بیان ژن سنجیده شد.

کلونیدین:

کلونیدین را بعنوان **آگونیست پری سیناپس** یا **مرکزی** انتخاب کرده ایم چرا که سبب کاهش فعالیت سیستم آدرنرژیک می شود. کلونیدین (آگونیست آلفا ۲ پیش سیناپسی) در واقع یک داروی آنتی آدرنرژیک مرکزیست که با مهار گیرنده های آلفا آدرنرژیک سبب کاهش فعالیت سیستم سمپاتیک می گردد. گیرنده یا رسپتور آلفا ۲ در ناحیه پره یا پیش سیناپسی اگر تحریک شود سبب کاهش ریلیز یا رهائش کاته کولامین ها شده پس نقش اتورسپتور یا مهار کننده داشته و از نظر **فارماکولوژیک کلونیدین نقش آنتاگونیستی** در عملکرد سیستم سمپاتیک را بازی می نماید. باید توجه داشت کلاً داروهای آنتی آدرنرژیک مرکزی موجب مهار رهائش یا ریلیز کاته کولامین ها (آدرنالین، نورآدرنالین و دوپامین) که معمولاً در پاسخ استرس آزاد می شوند، می گردند. لذا کلونیدین هیدروکلراید با کاهش ضربان قلب و با گشاد کردن جدار عروق بعنوان داروی ضد فشارخون قدیمی با نام تجارتی **کاتاپرس** در درمان هایپرنتشن کاربرد دارد. این دارو بیش از چهل سال است که مصرف بالینی دارد و طیف عملکرد وسیع آن به علت خاصیت آنتی آدرنرژیک بودن مرکزی آن است.

Schematic of several cumulus cells that send transzonal projections (TZPs) through the zona pellucida to connect to the oocyte.

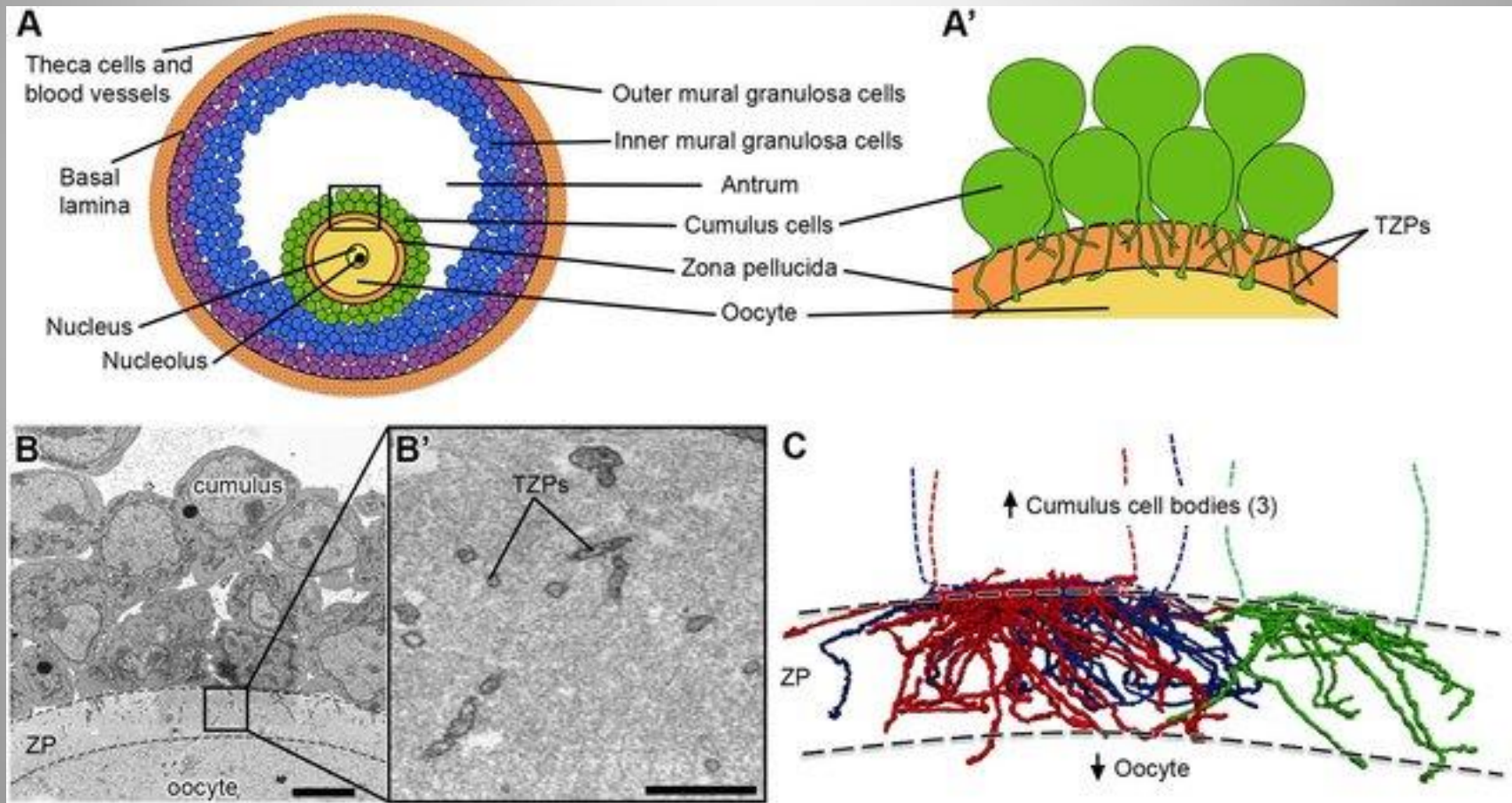


Figure 1. Morphological images of cumulus cells in the control group

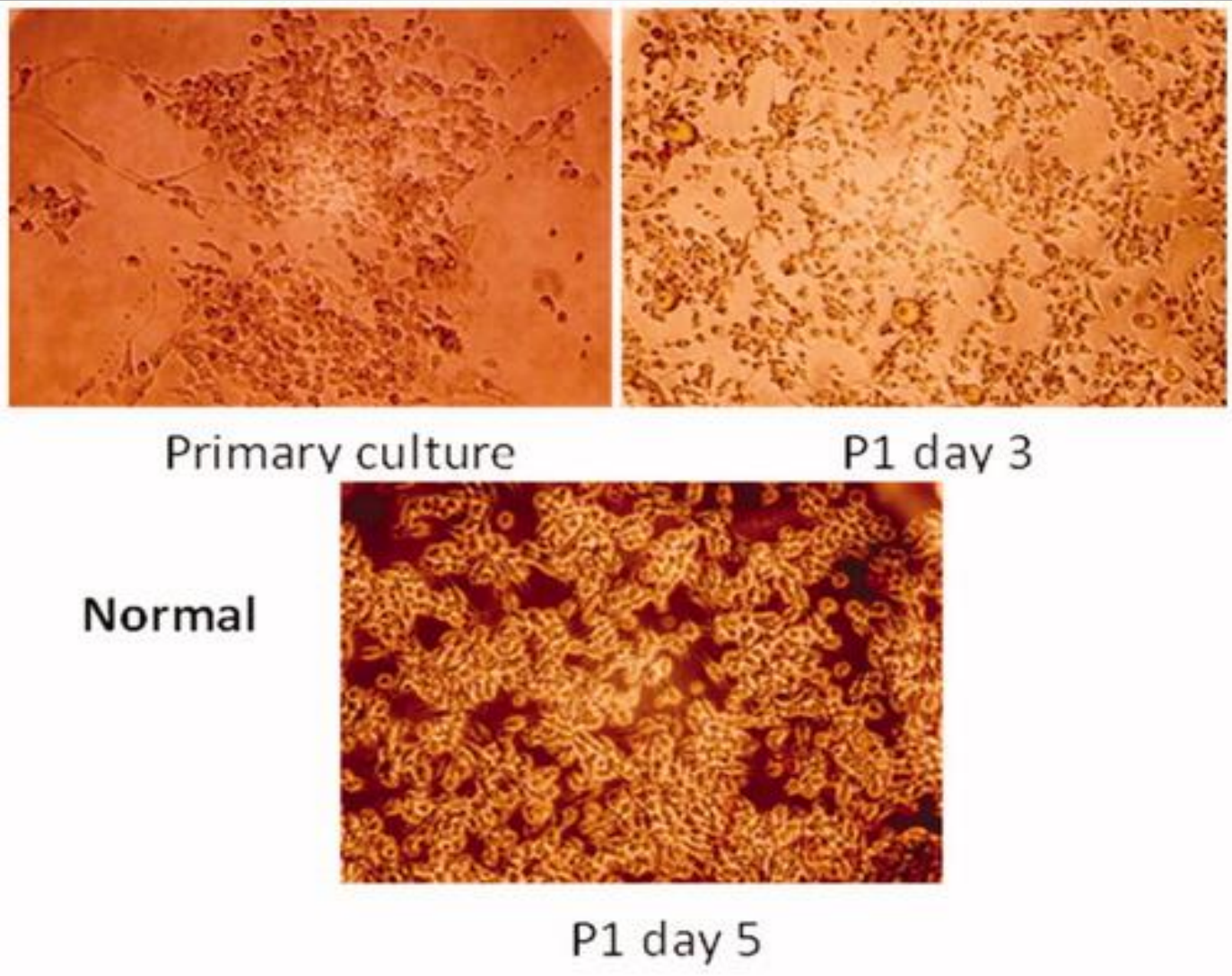
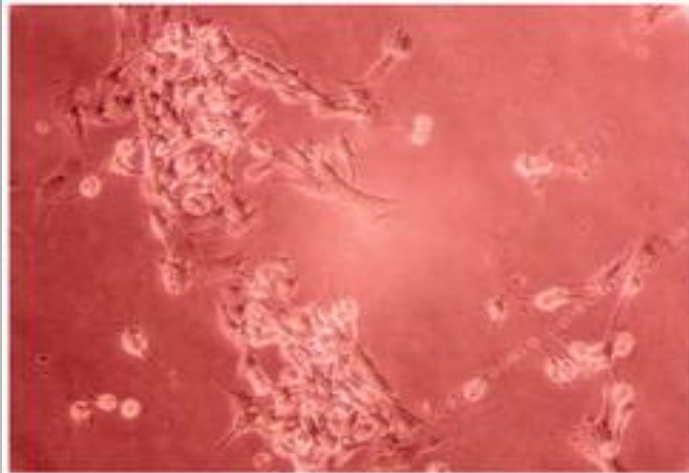
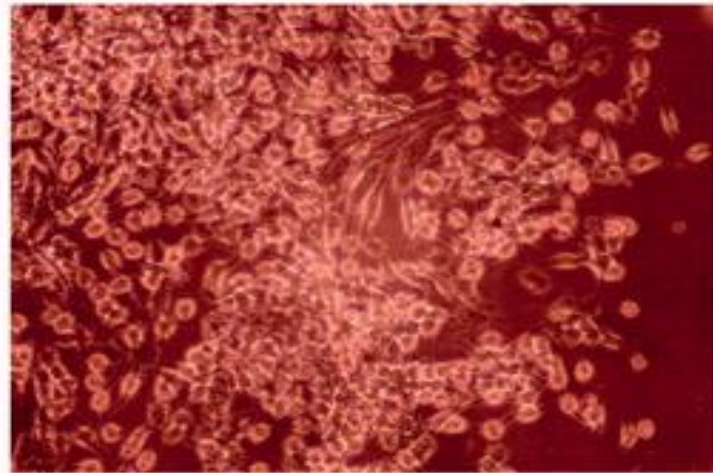


Figure 2. Morphological images of cumulus cells in the POR group

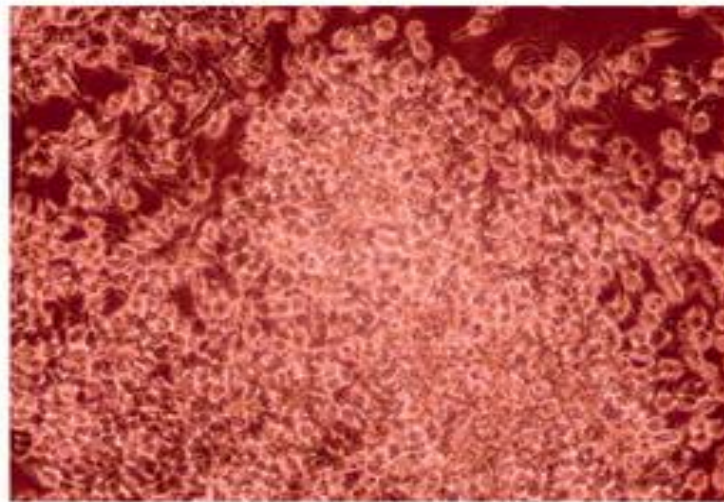


Primary culture day



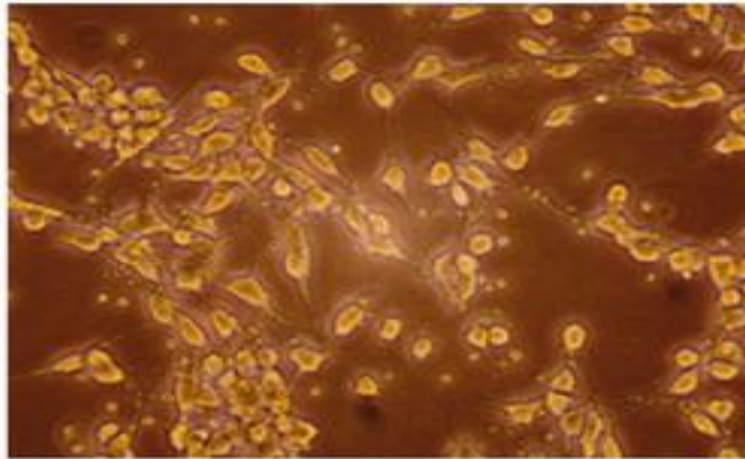
P1 day 3

POR

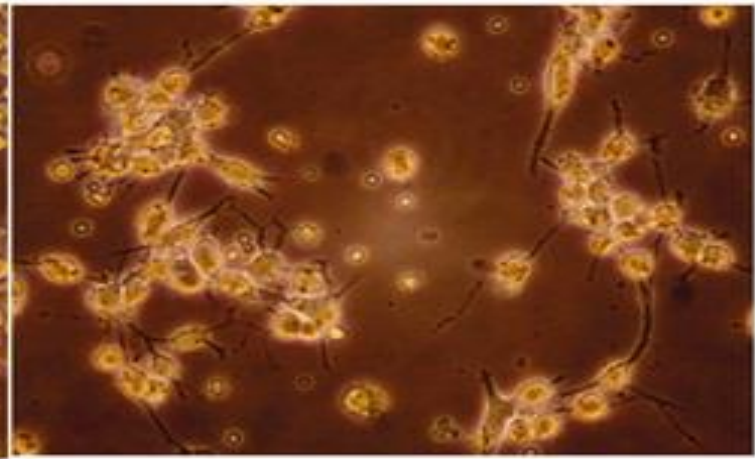


P1 day 5

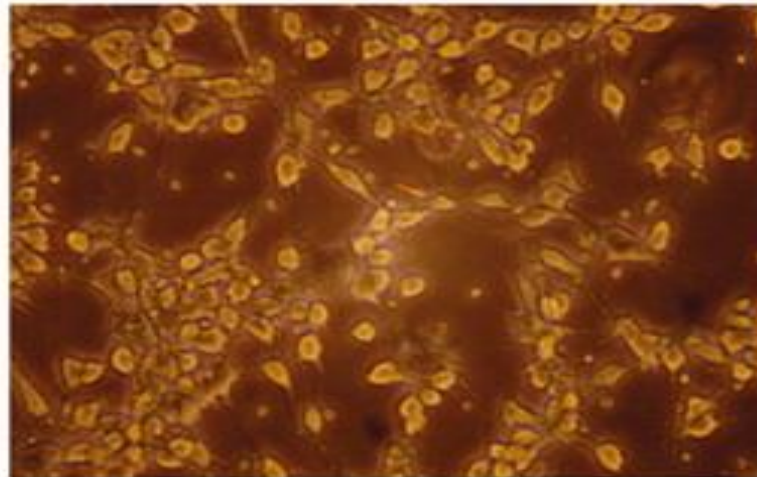
Figure 3. Morphological images of cumulus cells in the PCO group



Primary culture day



P1 day 3



PCOS

P1 day 5

Material & Method

Cumulus cell groups and drug treatment

Cumulus cells divided into six groups for treatment (clonidine) and non-treatment contains 5 cumulus cells in every group.

Group 1, 2: POR cumulus cell + treatment & non-treatment

Group 3, 4: PCOS cumulus cell + treatment & non-treatment

Group 5, 6: control cumulus cell (egg donation) + treatment & non-treatment

Clonidine as a selective agonist for the α_2 -adrenergic receptor can modulate the sympathetic output. In this study, we evaluated the effect of clonidine on the cumulus cell culture medium (0.5 ng/ml) as described in our previous studies

نقش معنی دار سیستم سمپاتیک در عملکرد تخمدان

نقش فعال و اساسی سیستم عصبی سمپاتیک در محور مغز-تخمدان در دو روند مهم استروئیدوژنزیس و فولیکوژنزیس می باشد. در زنان پورر اسپانس احتمالاً به علت کاهش سطح استروژن در فرآیندهای حلقه فیدبک محور مغز-تخمدان دو روند استروئیدوژنزیس و فولیکوژنزیس دچار اختلال میشود. این تغییرات می تواند منجر به افزایش نورآدرنالین شده و لذا در دسترس بودن نوروترانس میتر بیشتر منجر به مخفی شدن گیرنده ها در غشاء سلولی کومولوس می شود که نتایج ما با (Down- regulation) یا کاهش بیان ژن گیرنده آلفا در محیط کشت کومولوس همراه بود که مطالعه Ansonoff و ایتو در ۲۰۰۱ همکاران در ۲۰۰۵ را که در موش صحرایی انجام شده تایید می نماید.

استروژن و گیرنده آلفا ۲ - آدرنرژیک

از آنجایی که هورمونهای استرویدی زنان نقش مهمی را در تنظیم سیستم گیرنده آدرنرژیک به عهده دارند، برای نمونه حتی بیان ژن گیرنده آلفا ۲، در نخاع نیز پس از پیش‌درمانی با استروژن افزایش می‌یابد که می‌توان آن را به شیوع بیشتر سندرم‌های درد در زنان استناد داد. این مطالعه نیز تاییدی می‌باشد که کاهش استروژن در زنان با پاسخ ضعیف تخمدانی می‌تواند در محور مغز-تخمدان موجب افزایش نورآدرنالین و در نتیجه کاهش بیان ژن گیرنده آلفا ۲ شود.

مکانیسم سمپاتیکی در فرآیندهای تخمدانی

مکانیسم عمل گیرنده آلفا به طور لوکال در تخمدان از طریق اتصال نورآدرنالین با گیرنده مذکور است. فعالیت این گیرنده سبب افزایش جریان خون تخمدانی شده و کما بیش سایت های استروئیدوژنی را که مشتق از لیپوپروتئین های سرمی هستند (به عنوان منبع کلسترول) را برای روند استروئیدوژنز فعال می نماید. پس میتوان این اثر را چنین پیشنهاد داد که کاهش بیان ژن دو گیرنده آلفا یک و آلفا دو میتواند در روند پیری (aging) تخمدان موثر باشد. گفتنی است که تاکنون در مورد ضعف فرآیندهای تخمدانی در زنان پوررسپانس هیچ گزارشی جز در زمینه **Assisted-reproductive technology** فناوری تولیدمثل کمک شده وجود ندارد و این اولین بار است که فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک مطالعه و گزارش داده شده است.

Clonidine

Clonidine, sold as the brand name **Catapres** among others, is a medication used to treat high blood pressure, attention deficit hyperactivity disorder, drug withdrawal (alcohol, opioids, or smoking), menopausal flushing, diarrhea, spasticity and certain pain conditions. It is used by mouth, by injection, or as a skin patch.

Clonidine crosses the blood-brain barrier.^[5]

Receptor	K_i (nM) ^[60]
<u>Alpha-1A adrenergic receptor</u>	316.23
<u>Alpha-1B adrenergic receptor</u>	316.23
<u>Alpha-1D adrenergic receptor</u>	125.89
<u>Alpha-2A adrenergic receptor</u>	42.92
<u>Alpha-2B adrenergic receptor</u>	106.31
<u>Alpha-2C adrenergic receptor</u>	233.1

The K_i refers to a drug's affinity for a receptor. The smaller the K_i , the higher the affinity for that receptor.^[61]

Clonidine treats high blood pressure by stimulating α_2 receptors in the brain stem, which decreases peripheral vascular resistance, lowering blood pressure. It has specificity towards the presynaptic α_2 receptors in the vasomotor center in the brainstem. This binding has a sympatholytic effect, suppresses release of norepinephrine, ATP, renin, and neuropeptide Y which if released would increase vascular resistance

Table 1. Gene expression of ADR- α 1

DRα1					
groups	Mean	SD	Median	<i>p-Value^a</i>	<i>p-Value^b</i>
Without treatment					
cumulus cell	1.00	0.00	1.00		
PCO	1.68	0.21	1.80	<.001	
POR	0.47	0.03	0.47	.003	
Clonidine treatment					
cumulus cell	0.96	0.09	0.91		.999
PCO	1.31	0.19	1.24		.042
POR	0.48	0.04	0.48		.999

able 5. Gene expression of ADR- α 2

	ADR α 2				
	Mean	SD	Median	<i>p</i> -Value ^a	<i>p</i> -Value ^b
Without treatment					
cumulus cell	1.00	0.00	1.00		
PCO	1.68	0.21	1.79	<.001	
POR	0.58	0.02	0.58	.004	
Clonidine treatment					
cumulus cell	0.92	0.09	0.93		.999
PCO	1.16	0.07	1.16		.001
POR	0.52	0.04	0.51		.999

POR: Poor responder group. *p*-Values were computed with the ANOVA test and adjusted by Bonferroni multiple comparison corrections.

^a *p*-Value: Comparison with normal cumulus cell ($p < .001$).

^b *p*-Value: Comparison between with and without clonidine treatment.

Table 6. Gene expression of ADR- β 2

	ADR β 2				
	Mean	SD	Median	<i>p</i> -Value ^a	<i>p</i> -Value ^b
Without treatment					
cumulus cell	1.00	0.00	1.00		
PCO	1.68	0.21	1.80	<.001	
POR	1.01	0.11	0.95	.999	
Clonidine treatment					
cumulus cell	0.96	0.12	0.99		.999
PCO	1.21	0.10	1.16		.005
POR	0.93	0.03	0.95		.999

POR: Poor responder group. *p*-Values were computed with the ANOVA test and adjusted by Bonferroni multiple comparison corrections.

^a ***p*-Value: Comparison with normal cumulus cell ($p < 0.001$).**

^b ***p*-Value: Comparison between with and without clonidine treatment.**

نتایج: سطح بیان **mRNA** با میانگین، میانه و انحراف استاندارد در سه

گیرنده آدرنوسپتوری ۱، ۲ **ADR- α** در جداول ۱ و ۲ و گیرنده **ADR- β**

در جدول ۳ ارائه شد. مقایسه بیان ژن گروه ها از طریق **ANOVA** یک طرفه

انجام شد. مقادیر **P** با تصحیح مقایسه چندگانه **Bonferroni** تنظیم

و ضریب همبستگی اسپیرمن درجه ارتباط سه گیرنده را نشان داد (جدول ۴).

نتایج فوق نشان می دهد که بیان ژن دو گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱ و ۲

در سلولهای کومولوس در محیط کشت بین **دو گروه مطالعه (تخمدان ضعیف) و**

کنترل کاهش معناداری دارد و حال آنکه در مورد گیرنده بتا ۲ این بیان تغییر

معناداری را بین دو گروه موردنظر نشان نمی دهد. نتایج ضریب همبستگی

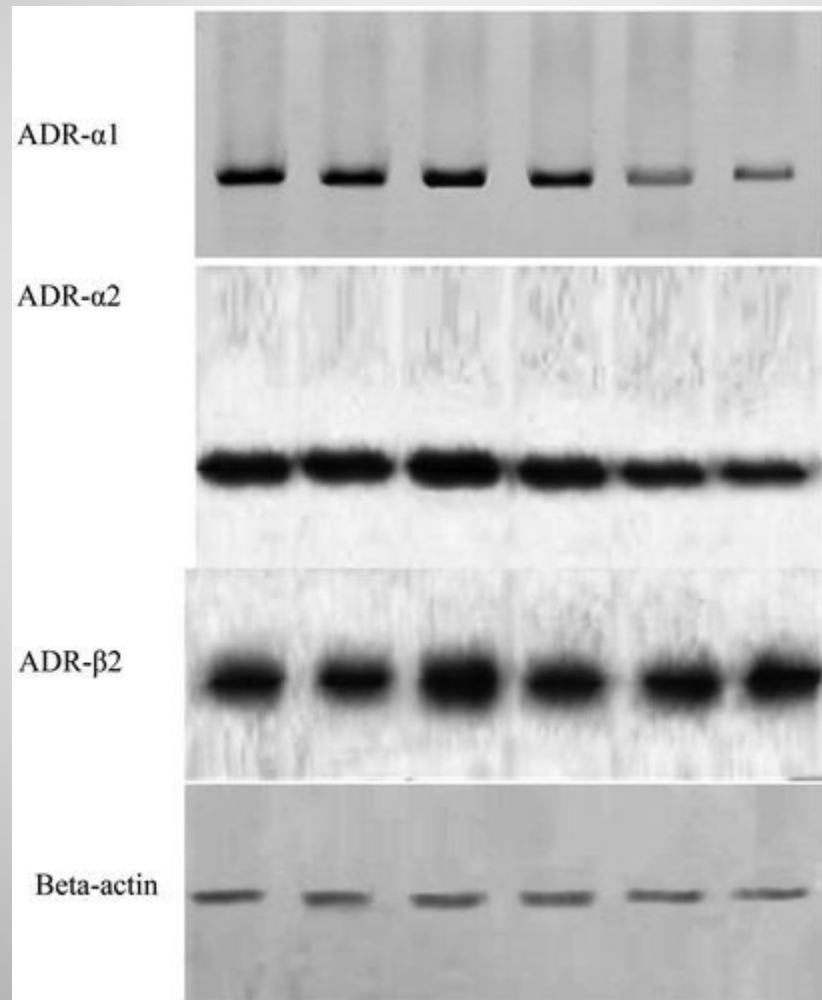
نیز ارتباط سه گیرنده آدرنوسپتوری و تأثیرپذیری از یکدیگر را تأیید

می نماید.

Protein immunoblot

Because the secondary antibody used in this study was linked with Horseradish peroxidase (HRP), the chromogen 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) was used to detect the proteins. Expression at protein levels represents mRNA conversion to the protein that was increased in PCO women

Fig4. The analysis of three adrenoceptors: ADR- α 1, 2 and ADR- β 2 gene expression at protein levels. Blot images of Western blot proteins ADR-a1, ADR-a2, ADR- β 2, and Beta-actin: beta-actin is considered as the home-protein and test control protein.



نتیجه: نتایج حاصل از این تحقیق دلالت می نماید که بیان ژن آدرنوسپتورها در محیط کشت سلول های کومولوس به عنوان نزدیک ترین سلول به تخمک به طور معنی دار افزایش می یابد و درمان با کلونیدین به شدت توانست سبب کاهش این پرکاری شود با نمایه بیان ژن به ترتیب زیر: $ADR-\alpha 2 < ADR-\beta 2 < ADR-\alpha 1$ در زنان مبتلا به PCOS به عبارت دیگر کلونیدین توانست افزایش بیان ژن را تعدیل نماید. اما در زنان POR کاهش بیان ژن گیرنده های فقط آلفا ۱ و ۲ مشاهده شد که بیانگر نقش موثر گیرنده آلفا در روند پیری تخمدان می باشد و کلونیدین بر این روند تأثیری نداشت.

Therefore, the sympathetic nervous system hyperactivity with higher density of the catecholamine innervation in **PCOS**. Clonidine decreased it strongly with $ADR-\alpha1 < ADR-\beta2 < ADR-\alpha2$, respectively in PCO women. In **POR** women, **decreased $ADR-\alpha1, 2$ expression** may lead to the **aging** process in the ovaries. This reduction does not allow that clonidine to influence on the CCs culture, because clonidine is the agonist of $\alpha2$ presynaptic (autoreceptor) that reduces sympathetic activity.

انجام این قبیل مطالعات در سطح بیان ژن گیرنده های نوروترانس
میترها که در این مطالعه نورآدرنالین بود می تواند رهگشای
استفاده فارماکولوژیک در سطح فناوری تولیدمثل برای دستیابی به
فولیکول مناسب گردد.

السَّلَامُ عَلَيْكَ يَا بَاصِلَ الْهَدَى



شیخ محمود شبستری شاعر نامدار ایران (720 هجری قمری)

بسی گفتند از عیسی و مهدی

مجرد شو، تو هم عیسای عهدی

ز مهدی، گرچه روزی چند، پیشی

بکش دجال خود مهدی خویشی