بررسی بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱، ۲ و بتا ۲ سلول‌های کومولوس تخمدان زنان نابارور با پاسخ ضعیف تخمدانی کاندید لقاح آزمایشگاهی

فریده ظفری زنگنه[1*]، محمد مهدی نقی‌زاده[2]، مریم باقری[3]، معصومه دهقان[4]

۱- مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج)، بیمارستان ولیعصر ۲، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
۳- گروه بهداشت باروری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- مرکز IVF بیمارستان امام‌خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، بیمارستان امام خمینی، بیمارستان ولیعصر ۲، طبقه اول، مرکزتحقیقات بهداشت باروری ولیعصر.
تلفن: ۶۶۵۸۱۶۱۶-۰۲۱
E-mail: zangeneh14@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۴ آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۳۱

زمینه و هدف: بیشتر مطالعات نشان می‌دهد ۹ تا ۲۴٪ افرادی که در سیکل لقاح آزمایشگاهی (IVF) قرار می‌گیرند زنانی هستند که پاسخ تخمدانی آن‌ها ضعیف است. زنان با پاسخ ضعیف تخمدانی Poor ovarian response (POR) بیماران ناباروری هستند که ذخیره تخمدان و پاسخ تخمدان به داروها کم و کیفیت تخمک در آن‌ها رو به زوال است. هدف این مطالعه بررسی بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیکی در سلول‌های کومولوس زنان پاسخ ضعیف تخمدانی در محیط کشت بود.

روش بررسی: این مطالعه موردی-شاهدی از فروردین تا دی ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات بهداشت باروری بیمارستان امام خمینی (ره) تهران بر روی دو گروه مطالعه و کنترل (اهدا کننده تخمک) انجام شد. هر دو گروه با ضوابط محدوده سنی ۲۰ تا ۴۵ سال و داشتن اندکس توده بدنی زیر $28\ m^2/kg$ وارد مطالعه شدند و ضوابط خروج شامل عدم مصرف دارو بجز داروهای تحریک‌کننده تخمدان و عدم ابتلا به بیماری بود. تشخیص پاسخ ضعیف تخمدان با معیار بولونیا (Bologna) انجام شد. پس از پانکچر فولیکول‌ها، کومولوس‌ها از کمپلکس تخمک-کومولوس جدا و با لام نئوبار شمارش و به محیط کشت اضافه شد. استخراج RNA انجام و غلظت RNA خوانده شد. cDNA سنتز و برای ژن‌های B2 و ADRα1,2 پرایمر طراحی و بیان ژن سنجیده شد.

یافته‌ها: مقایسه نتایج بیان ژن فقط در گیرندهٔ آلفا ۱ و ۲ سلول‌های کومولوس در دو گروه مطالعه و کنترل، کاهش معناداری نشان داد. ضریب همبستگی نیز نشان داد که بین گیرنده‌های آدرنرژیک و اثرات آن‌ها بر یکدیگر رابطه معنادار وجود دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعهٔ حاضر کاهش بیان ژن دو گیرنده آلفا ۱ و ۲ در این زنان را نشان داد.

کلمات کلیدی: گیرنده‌های آدرنرژیک، مطالعات مورد-شاهدی، سلول‌های کومولوس، بیان ژن، ناباروری، پاسخ ضعیف تخمدان، زنان.

مقدمه

عدم پاسخ مناسب به پروتکل‌های استاندارد درمان را جهت داشتن فولیکول مناسب "پاسخ ضعیف" می‌نامند که سبب کاهش تولید تخمک، کاهش چرخه یا سیکل طبیعی که به‌طورکلی بیمار با کاهش احتمال بارداری چشمگیری مواجه است.[1] ناباروری نه‌تنها به‌عنوان یک بیماری بلکه به‌عنوان یک مشکل جدی تأثیرگذار بر زندگی خانوادگی می‌تواند به بهداشت و سلامت خانواده در جامعه آسیب‌های جدی وارد نماید. کمابیش ۴۰ تا ۵۰٪ از کل ناباروری به‌علت فاکتورها و عوامل مربوط به زنان می‌باشد.[2] گزارشات نشان

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

می‌دهد که ۳۰ تا ٤۰٪ از کل ناباروری به‌علت اختلال در عملکرد تخمدان است.[۳] میزان درصد شیوع پاسخ ضعیف تخمدان Poor ovarian response (POR) ۹ تا ۲٤٪ گزارش شده است.[٤] اگرچه عوامل عصبی عضلانی و رحمی ممکن است باروری را با افزایش سن زنان نیز کاهش دهد، اما عامل اصلی و مهم این مشکل کاهش ذخایر فولیکول تخمدان است.[٥] کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه یا پریموردیال با افزایش سن سبب کاهش معناداری در کیفیت تخمک و عوامل جانبی آن می‌شود که از دو جنبه بر نوکلئوس تاثیرگذار است ۱) آنیوپلوییدی، شکل‌گیری اسپیندل غیرطبیعی و ۲) سیتوپلاسم، با کاهش تعداد میتوکندری، ذخایر ATP یا آدنوزین تری‌فسفات و ناهنجاری‌های ساختار سیتواسکلت نوکلئوس قابل ذکر می‌باشد.[٦] افزایش سن زنان به‌طور آشکار با آنئوپلویید اووسیت مرتبط است. همچنین ناهنجاری‌های زونا پلوسیدا نیز در اووسیت‌های ناشی از پاسخ‌دهندگان ضعیف مورد توجه می‌باشد. به‌خوبی مشخص شده است که پاسخ‌های ضعیف تخمدان به پروتکل‌های درمانی تحریک شده تخمدان با افزایش سن زنان افزایش می‌یابد.[٦] براساس معیار بولونیا (Bologna)، حداقل دو مورد از ویژگی‌های زیر برای تعریف پاسخ تخمدان ضعیف لازم است: سن مادر بیش از ٤۰ سال، داشتن یک پاسخ ضعیف پیشین یعنی سه یا کمتر از سه تخمک از پروتکل تحریک متعارف یا براساس قرارداد، شمارش فولیکول‌های آنترال Antral fulliculer count (AFC) کمتر از پنج تا هفت فولیکول یا هورمون آنتی‌مولرین Antimulerian hormone (AMH) که از ۰/۵ تا ۱/۱ ng/ml می‌باشد. با این‌حال، به‌طورکلی دو دوره با سه تخمک (Oocytes) یا کمتر از آن پس از تحریک تخمدان برای طبقه‌بندی بیمار به‌عنوان پاسخ ضعیف، حتی در نبود دو معیار دیگر، کافی می‌باشد.[۷] این معیار در سال ۲۰۱۱ توسط انجمن اروپایی انسانی و جنین‌شناسی (ESHRE) جهت کمک به پاسخ دادن واکنش‌های ضعیف تخمدان منتشر شده است. به‌تازگی گروهی از پژوهشگران با همکاری برای ایجاد POSEIDON (بیمار مبتنی بر استراتژی محور Individualize D oocyte number) با هدف بررسی تشخیص و مدیریت بیماران مبتلا به تخمدان پاسخ ضعیف (POR) یک طبقه‌بندی دقیق‌تری از زنان با پاسخ کم به تحریک تخمدان را پیشنهاد کرده‌اند.[۸] ممکن است در بیماران به‌نسبت جوان نیز این پاسخ ضعیف به درمان رخ دهد. چرا که مطالعات نشان می‌دهد که پاسخ ضعیف تخمدان با ناهمگونی درونی (Heterogeneous interesting) شامل زنانی می‌شود که از نظر فنوتیپ پاسخ‌دهنده ضعیف شمرده می‌شوند و می‌توانند جهش‌هایی در Gdf-9، Connexin37، Fuliculler stimulation hormone (FSH) و گیرنده‌های Luteinizing hormone (LH) افزون‌بر تغییرات ترشح هیپوفیز FSH-β را شامل شوند. افزون‌براین، کاهش در کیفیت و کمیت تخمک در زنان بالای ۳۵ سال امری شایع است.[۹] کنترل فولیکول تخمدان با تحریک چند بُعدی آن، سنگ بنای اصلی در درمان کمک باروری Assisted reproductive technologies (ART) به‌شمار می‌آید. فنآوری‌های کمک باروری برای غلبه بر ناباروری زنان و مردان طراحی شده است. از این‌رو مشکل عمده، محدودیت تعداد تخمک‌های مورد استفاده برای ART است.[۱۰] بروز واکنش تخمدان به تحریک در روند ART در زنان POR بین ۹ تا ۲٤٪ تخمین زده شده است که با افزایش سن زنان، شاخص تودهٔ بدنی (BMI) و با جراحی‌های صورت گرفته شده در تخمدان، ارتباط دارد.[۱۱] مطالعات زیادی روی تاثیر هورمون رشد در روند ART انجام شده است که نتایج آن یکسان نمی‌باشد. مطالعات مروری سیستماتیک و متاآنالیز نیز نقش مکمل هورمون رشد مکمل Growth hormone (GH) در پیش‌بینی پاسخ‌دهندگان ضعیف تخمدانی که تحت چرخه IVF/ICSI هستند را با افزایش رشد تخمک‌های بالغ و بهبود در پتانسیل رشد جنین همراه می‌داند.[۱۲] ولی پژوهش‌های جدید بیانگر آن است که درمان زنان پاسخ ضعیف در تمام مراحل روند اجرای فناوری تولیدمثل کمک شده Assisted-reproductive technology (ART) از جمله انتخاب آنالوگ GnRH، نوع گنادوتروپین و دوز آن، شروع فعالیت یا تریگر اوولاسیون یا تخمک‌گذاری و امکان استفاده از داروهای تجویزی، همگی تحت تأثیر یک پاسخ فردی هستند.[۱۳]

هدف در مطالعه حاضر بررسی بیان ژن سه گیرنده آدرنرژیک در سلول‌های کومولوس بود.

روش بررسی

این مطالعه موردی-شاهدی از فروردین تا دی ۱۳۹٦ در مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج) بیمارستان امام خمینی (ره) تهران انجام شد. زنان پس از تشخیص تخمدان پاسخ ضعیف با مفاهیم معیارهای ESHRE بولونیا در درمانگاه نازایی بیمارستان

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

امام‌خمینی (ره) تهران و سپس تجویز داروهای محرک تخمک‌گذاری با پروتکل دارویی آنتاگونیسم ۱۵ در دو گروه مطالعه و کنترل وارد مطالعه شدند. معیارهای ورود دو گروه مطالعه و کنترل شامل: محدودهٔ سنی ۲۰ تا ٤۰ سال و شاخص توده بدنی زیر ۲۸ kg/m^2 بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل: عدم ابتلا به بیماری دیگر و عدم مصرف داروی دیگر (بجز داروهای محرک تخمک‌گذاری) بود. مرحله بعد گرفتن تخمک یا عمل پانکچر در دو گروه انجام شد. سپس مایع فولیکولی گردآوری و مجموعه کومولوس-تخمک جدا و سلول‌های کومولوس توسط آنزیم از تخمک جدا شده و کشت داده شدند.

تهیه محیط کشت سلول: سلول‌های کومولوس در محیط کشت Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) و FBS (سرم جنین گاوی به‌عنوان فاکتور رشد) ۱۰٪ در پلیت ۳ cm که کف پلیت دارای پوششی از ژلاتین ۰/۱ تا ۰/۲ cm^2/mg (Gelatin Solution 2%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Cat. # G1393) بود در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ و در معرض CO_2 (گاز دی‌اکسیدکربن) ۵٪ کشت صورت گرفت. پس از دو دوره پاساژ ٤۸ تا ۱۰۲ ساعت (روز پنجم) با به‌دست آوردن بهترین تراکم سلولی یا پاساژ مراحل کشت پایان یافت. مرحلهٔ بعد، استخراج RNA از سلول‌های کومولوس بود که غلظت RNA مورد نظر با دستگاه Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) خوانده شد. سپس cDNA سنتز و برای ژن‌های ADRB2 و ADRα1, 2 پرایمر طراحی و بیان ژن توسط تکنیک Real-time polymerase chain reaction (PCR) سنجیده شد. محاسبه حجم نمونه: در روش محاسبهٔ حجم نمونه از بیماران پاسخ ضعیف به‌عنوان گروه مورد مطالعه و خانم‌های اهداءکننده تخمک (Egg donation) به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد. در مجموع دو گروه (گروه مطالعه و کنترل) که هر گروه شامل کومولوس‌های کشت داده شده پنج تخمک می‌شد که در بین سایر تخمک‌ها مناسب‌تر بودند.

آنالیز اولیه با بررسی منحنی تکثیر امکان‌پذیر است و با تنظیم خط آستانه و تعیین میزان سیکل آستانه (Ct) فراهم شد. بیشتر نرم‌افزارها تعداد سیکل‌ها را روی محور x و لگاریتم میزان فلورسانس ΔRn را روی محور y نشان می‌دهند. در این مطالعه از روش سنجش نسبی استفاده شد. در این روش چند ژن به‌صورت تناسبی با هم مقایسه می‌شوند. در این روش تعداد دقیق ژن‌ها تعیین نمی‌شود بلکه با ژن مرجع (آندوژن یا خانه‌دار) مقایسه می‌شوند که خود شامل چندین روش است در این تحقیق از روش مقایسه ای ΔΔCt استفاده شد. سپس آنالیز داده‌ها توسط REST 2008, Version 2.0.13 (Technical University of Munich, Germany) محاسبه گردید.

داده‌های حاصل از بیان ژن سه گروه گیرنده آدرنرژیک در دو گروه مطالعه و کنترل با استفاده از روش‌های ناپارامتری Kruskal-Wallis، Mann-Whitney U test و Bonferroni post-hoc و همبستگی بین بیان ژن‌ها با ضریب همبستگی Pearson محاسبه شد. تجزیه و تحلیل با استفاده از SPSS software, version 24 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد. مقدار $P<0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

یافته‌های مورفولوژیک سلول کومولوس: با توجه به زمان رشد سلول‌ها، ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه، یعنی پس از ۸۰٪ پر شدن سطح پلیت و پاساژ سلول‌ها، سلول‌ها قدرت چسبندگی و تکثیر را حفظ و قابلیت برنامه‌ریزی برای گروه‌بندی و تیمار با دارو را در روز پنجم نشان دادند. تصاویر زیر نمایانگر مورفولوژی سلول‌های کومولوس می‌باشد که در دو گروه یکسان ولی تفاوت در کیفیت سلول‌ها مشهود می‌باشد.

سطح بیان mRNA با میانگین، میانه و انحراف استاندارد در سه گیرنده آدرنوسپتوری (ADR-α1,2) (جداول ۱ و ۲) و (ADR-β2) (جدول ۳) ارایه شد. مقایسه بیان ژن گروه ها از ANOVA یک طرفه مقایسه شد. مقادیر P با تصحیح مقایسه چندگانه Bonferroni تنظیم شد. همبستگی بین بیان ژن با ضریب همبستگی درجه اسپیرمن محاسبه شد (جدول٤).

نتایج فوق نشان داد که بیان ژن دو گیرنده آدرنرژیک آلفا ۱ و ۲ در سلول‌های کومولوس در محیط کشت بین دو گروه مطالعه و کنترل کاهش معناداری دارد و حال آن‌که در مورد گیرنده بتا ۲ این بیان تغییر معناداری را بین دو گروه موردنظر نشان نداد. نتایج ضریب همبستگی نیز ارتباط سه گیرنده آدرنوسپتوری و تأثیرپذیری از یکدیگر را تأیید نمود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

جدول ۱: مقایسه میانه و انحراف‌معیار و میانگین بیان ژن گیرنده ADR-α1 در سلول‌های کومولوس دو گروه کنترل و تخمدان پاسخ ضعیف

سلول‌های کومولوس	گیرنده آلفا آدرنرژیک ۱			
	میانگین	انحراف‌معیار	میانه	معناداری
گروه کنترل	۱	۰	۱	
گروه مطالعه	۰/٤۷	۰/۰۳	۰/٤۷	۰/۰۰۳

سطح معناداری: مقایسه سلول کومولوس گروه کنترل و مطالعه (P<۰/۰۰۳). مقادیر سطح معنا داری با استفاده از آزمون ANOVA محاسبه و توسط تصحیح مقایسه چندگانه Bonferroni تنظیم شد.

جدول ۲: مقایسه میانه و انحراف‌معیار و میانگین بیان ژن گیرنده ADR-α2 در سلول‌های کومولوس دو گروه کنترل و تخمدان پاسخ ضعیف

سلول‌های کومولوس	گیرنده آلفا آدرنرژیک ۲			
	میانگین	انحراف‌معیار	میانه	معناداری
گروه کنترل	۱	۰	۱	
گروه مطالعه	۰/۵۸	۰/۰۲	۰/۵۸	۰/۰۰٤

سطح معناداری: مقایسه سلول کومولوس گروه کنترل و مطالعه (P<۰/۰۰٤)، مقادیر سطح معناداری با استفاده از آزمون ANOVA محاسبه و توسط تصحیح مقایسه چندگانه Bonferroni تنظیم شد.

جدول ۳: مقایسه میانه و انحراف‌معیار و میانگین بیان ژن گیرنده ADR-β2 در سلول‌های کومولوس دو گروه کنترل و تخمدان پاسخ ضعیف

سلول‌های کومولوس	گیرنده بتا آدرنرژیک ۲			
	میانگین	انحراف‌معیار	میانه	معناداری
گروه کنترل	۱	۰	۱	
گروه مطالعه	۱/۰۱	۰/۱۱	۰/۹۵	۰/۹۹۹

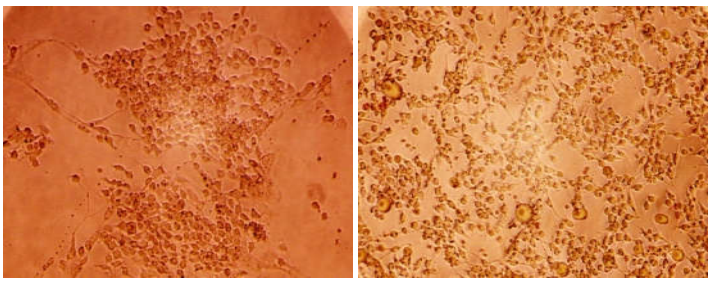
سطح معناداری: مقایسه سلول کومولوس گروه کنترل و مطالعه، مقادیر سطح معناداری با استفاده از آزمون ANOVA محاسبه و توسط تصحیح مقایسه چندگانه Bonferroni تنظیم شد.

جدول ٤: بررسی همبستگی بیان ژن‌ها با ضریب همبستگی Pearson

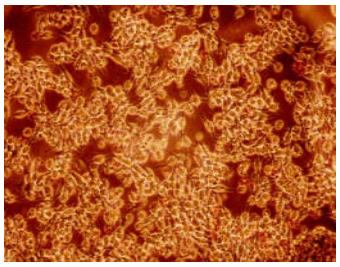
		ADRα1	ADRα2	ADRβ2
گیرنده آلفا آدرنرژیک ۱	r		۰/۹۷۷	۰/۸۳۱
	P		۰/۰۰۱<	۰/۰۰۱<
گیرنده آلفا آدرنرژیک ۲	r	۰/۹۷۷		۰/۸۸٦
	P	۰/۰۰۱<		۰/۰۰۱<
گیرنده بتا آدرنرژیک ۲	r	۰/۸۳۱	۰/۸۸٦	
	P	۰/۰۰۱<	۰/۰۰۱<	

r: ضریب همبستگی Pearson.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

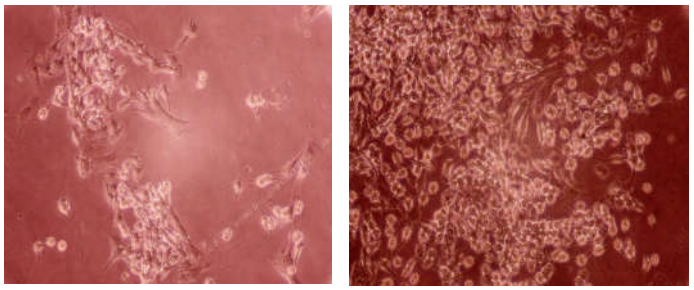


روز اول کشت اولیه ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه

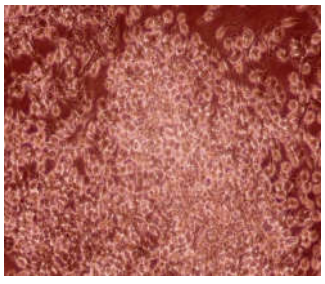


روز پنجم کشت کومولوس

شکل ۱: تصاویر مورفولوژیک کشت سلول‌های کومولوس در گروه کنترل (زنان تخمک اهدایی)



روز اول کشت اولیه ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه



روز پنجم کشت کومولوس

شکل ۲: تصاویر مورفولوژیک کشت سلول‌های کومولوس در گروه مطالعه (زنان پاسخ ضعیف)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن در سطح mRNA گیرنده‌های سمپاتیک آلفا ۱ و ۲ در این زنان در سطوح پایین‌تری از گروه نرمال است که بیانگر کاهش فعالیت این دو گیرنده در سلول کومولوس زنان با پاسخ ضعیف تخمدانی می‌باشد. اما بیان ژن گیرنده بتا ۲ در دو گروه کنترل و پاسخ ضعیف معنادار نبود. از این‌رو با توجه به یافته‌های فوق، پیشنهاد می‌شود که در این زنان به احتمال کمبود استروژن سبب افزایش نورآدرنالین و مخفی شدن گیرنده‌ها در غشاء سلول کومولوس (Down-regulation) و از این‌رو کاهش بیان ژن سطوح mRNA در دو گیرنده آلفا ۱ و ۲ شده است که می‌تواند بیانگر حضور بیشتر نوروترانسمیتر نورآدرنالین برای این تظاهر در سطح تخمدانی باشد. البته گفتنی است که نقش استروژن حتماً در بروز این روند می‌تواند یک نقش کلیدی باشد، چرا که اثر سینرژیسم فیزیولوژیک این پرکاری سیستم عصبی سمپاتیک در روند افزایش سن کمابیش با کاهش میزان استروژن همراهی می‌کند. این اثر ابتدا در محور مغزی هیپوتالاموس–هیپوفیز–گنادال تظاهر می‌نماید و سپس می‌تواند به خاطر نقش فیدبکی یا بازخورد استروژن–نورآدرنالین بر روی سیستم عصبی سمپاتیک تخمدان تأثیرگزار باشد که در این زنان با کاهش سطح استروژن رخ می‌دهد و قابل مقایسه با روند یائسگی است. متأسفانه نقش عملکرد هیپوتالاموس–هیپوفیز در روند یائسگی به‌طور کلی نادیده گرفته شده است.

یائسگی یک رویداد عادی در زندگی است که علایم نورولوژیک را در مرحله‌ی پری‌منوپوز آن بیشتر می‌توان دید. مطالعات نشان می‌دهند که حساسیت‌زدایی حلقه‌ی فیدبک Hypothalamic-pituitary-ovarian (HPO) در این روند نقش مهمی را بازی می‌کند.[۱۴] به‌نظر می‌رسد این حساسیت‌زدایی توسط استروژن رخ می‌دهد. استروژن یک تنظیم‌کننده اصلی است که از طریق شبکه‌ای از گیرنده‌های استروژن فعال می‌شود تا مغز در بازه‌های زمانی سریع، متوسط و طولانی برای پاسخگویی به سوخت‌وساز انرژی در مغز از طریق مسیرهای هماهنگ شده سیگنالینگ و رونویسی پاسخ دهد. به‌عبارتی گیرنده‌های آن در مغز کنترل‌کننده متابولیک یا سوخت‌وساز درون مغزی را به‌عهد دارند.[۱۵] در روند یائسگی پرکاری سیستم سمپاتیک می‌تواند منجر به افزایش فشارخون و مشکلات قلبی شود. برای مثال علایم وازوموتور از جمله گُرگرفتگی یا عرق شبانه در دوران یائسگی که تاثیر نقش گیرنده آلفا ۲ در آن محرز می‌باشد را می‌توان ذکر کرد.[۱۶و۱۷] مطالعات نشان داده که نورآدرنالین تعدیل‌کننده بازخورد یا مکانیسم فیدبکی استرویید تخمدانی در مورد رهایش هورمون لوتئینیزه (LH) نیز می‌باشد. مطالعه Helena و همکاران نشان داد که ترشح LH در موش‌های اوفورکتومی شده به‌طور مثبت توسط فعالیت نورآدرنرژیک پایه در (POA) منطقه پری‌اپتیک مغز تنظیم می‌شود و کاهش آن به‌نظر می‌رسد نقش مهمی در بازخورد یا فیدبک منفی استرویید‌های تخمدان بر ترشح هورمون لوتیینی در محیط In-vivo داشته باشد.[۱۸] همچنین گزارش شده است که هسته نورآدرنرژیک لکوس سرلئوس در هیپوتالاموس، تنظیم‌کننده ترشح هورمون لوتیینی در موش‌های صحرایی ماده می‌باشد. حضور هر دو گیرنده استروژن و پروژسترون در نورون‌های هسته لکوس سرلئوس که مهمترین هسته نورآدرنرژیک مغزی می‌باشد نقش مهمی را در محور مغز–تخمدان به‌عهده دارد که می‌تواند بیان‌کننده این امر باشد که نورون‌های یادشده احتمالا به تغییرات سطوح سرمی استرویید تخمدان پاسخ نورآدرنرژیکی می‌دهند.[۱۹] این مجموعه مطالعات بیانگر نقش فعال و اساسی سیستم عصبی سمپاتیک در محور مغز–تخمدان است که در دو روند مهم استرویید‌وژنزیس و فولیکوژنزیس نقش اساسی دارد. حال در زنان پوررسپانس احتمالاً به‌علت کاهش سطح استروژن در فرآیندهای حلقه فیدبک محور مغز–تخمدان دو روند استرویید‌وژنزیس و فولیکوژنزیس دچار اختلال می‌شود. این تغییرات می‌تواند منجر به افزایش نورآدرنالین شده و در دسترس بودن نوروترانسمیتر بیشتر منجر به مخفی شدن گیرنده‌ها (Down-regulation) در غشاء سلولی کومولوس را موجب شود که نتایج ما با کاهش بیان ژن دو گیرنده آلفا ۱ و ۲ در محیط کشت کومولوس آن را تایید می‌نماید. مطالعه Ansonoff و همکاران بر روی رحم موش صحرایی باردار نشان داد که وجود β۱۷–استرادیول در عملکرد میومتر سبب کاهش پاسخ انقباضی نورآدرنالین از طریق گیرنده‌های آلفا ۲ می‌شود و ممکن است باعث تغییر در مسیر سیگنالینگ پروتیین G شود. آن‌ها پیشنهاد کردند که اختلال در تنظیم استروژن ممکن است مسئول زایمان زودرس یا بی‌تحرکی رحم شود که از طریق آلفا ۲ می‌باشد. افزون براین، آن‌ها نشان دادند که تحریک ترشح نورآدرنالین در هیپوتالاموس به‌دلیل کاهش پیوند گیرنده‌های آلفا ۲ آدرنرژیکی به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

پروتیین G در هیپوتالاموس است که با کاهش بیان ژن گیرنده آلفا همراه می‌شود.[۲۰] از آن‌جایی که هورمون‌های استروییدی زنان نقش مهمی را در تنظیم سیستم گیرنده آدرنرژیک به‌عهده دارند، برای نمونه حتی بیان ژن گیرنده آلفا ۲ در نخاع را پس از پیش درمانی استروژن افزایش می‌دهد که می‌توان آن را به‌شیوع بیشتر سندرم‌های درد در زنان استناد داد.[۲۱] این مطالعه نیز تاییدی می‌باشد که کاهش استروژن در زنان با پاسخ ضعیف تخمدانی می‌تواند در محورمغز-تخمدان موجب افزایش نورآدرنالین و در نتیجه کاهش بیان ژن گیرنده آلفا ۲ شود. در مورد بیان ژن گیرنده آلفای یک بیشترین گزارشات در مورد تخمدان موش صحرایی است که با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی و وسترن‌بلات ثابت شده است.[۲۲] مکانیسم عمل گیرنده آلفا به‌طور لوکال در تخمدان پیشنهاد می‌شود که از طریق اتصال نورآدرنالین با گیرنده مذکور باشد چرا که فعالیت این گیرنده سبب افزایش جریان خون تخمدانی شده و کمابیش سایت‌های استروییدوژن را که مشتق از لیپوپروتیین‌های سرم هستند (به‌عنوان منبع کلسترول) برای روند استروییدوژنز فعال می‌نماید.[۲۳] پس می‌توان این پیشنهاد را داد که کاهش بیان ژن دو گرنده آلفا یک و دو می‌تواند در پیری (aging) تخمدان نقش مهم داشته باشد. گفتنی است که تاکنون در مورد ضعف فرآیندهای تخمدانی در زنان پوررسپانس هیچ گزارشی جز در زمینه فناوری تولیدمثل کمک شده Assisted-reproductive technology (ART) وجود ندارد و این اولین بار است که در مورد این زنان در قلمرو فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک و دو گیرنده آلفا ۱ و ۲ مطالعه و گزارش داده شده است. مطالعه در سطح بیان ژن این گیرنده‌ها می‌تواند رهگشای استفاده فارماکولوژیک در سطح فناوری تولیدمثل کمک شده (ART) برای دستیابی به فولیکول مناسب شود.

سپاسگزاری: با سپاس از همکاری معاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران، این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان: "بررسی تأثیر داروی کلونیدین بر تغییرات بیان ژن‌های دو گیرنده آدرنرژیکی ADRβ2 و ADRα1,2 بر میزان رشد سلول کومولوس اووفوروس بیماران ناباروری با پاسخ ضعیف یا Poor Response مراجعه‌کننده به درمانگاه نازایی بیمارستان ولی‌عصر (عج) مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره) تهران و مقایسه آن با کومولوس زنان سالم در محیط کشت" مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۶ به کد ۳۹۷۹۰ می‌باشد.

References

1. Badawy A, Wageah A, El Gharib M, Osman EE. Prediction and diagnosis of poor ovarian response: the dilemma. *J Reprod Infertil* 2011;12(4):241-8.
2. World Health Organization (WHO). Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Programme of Maternal and Child Health and Family Planning Unit [Internet]. Geneva: WHO; 1991 [cited 2020 May 15]. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/59769
3. Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2009;18 Suppl 2:19-24.
4. Ubaldi F, Vaiarelli A, D'Anna R, Rienzi L. Management of poor responders in IVF: is there anything new? *Biomed Res Int* 2014;2014:352098.
5. Maheshwari A, McLernon D, Bhattacharya S. Cumulative live birth rate: time for a consensus? *Hum Reprod* 2015;30(12) 2703-7.
6. Oehninger S, Hinsch E, Pfisterer S, Veeck LL, Kolm P, Schill WB, et al. Use of a specific zona pellucida (ZP) protein 3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function. *Fertil Steril* 1996;65(1):139-45.
7. Ferraretti AP, Gianaroli L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Hum Reprod* 2014;29(9):1842-5.
8. Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, Esteves SC, et al; Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing IndividualizeD Oocyte Number). A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016;105(6):1452-3.
9. Greenhouse S, Rankin T, Dean J. Genetic causes of female infertility: targeted mutagenesis in mice. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1282-7.
10. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;8(2):141-54.
11. Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH, et al. Comparison of 'poor' responders with 'good' responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991;6(7):918-21.
12. Kolibianakis EM, Venetis CA, Diedrich K, Tarlatzis BC, Griesinger G. Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009;15(6):613-22.
13. Haahr T, Esteves SC, Humaidan P. Individualized controlled ovarian stimulation in expected poor-responders: an update. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16(1):20.
14. Perlman B, Kulak D, Goldsmith LT, Weiss G. The etiology of menopause: not just ovarian dysfunction but also a role for the central nervous system. *Global Repro Health* 2018;3(2):e8.
15. Brinton RD, Yao J, Yin F, Mack WJ, Cadenas E. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Rev Endocrin* 2015;11(7):393-405.
16. Freedman RR. Menopausal hot flashes: mechanism, endocrinology, treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;142:115-20 .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

17. Rapkin AJ. Vasomotor symptoms in menopause: physiologic condition and central nervous system approaches to treatment. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(2):97-106.
18. Helena CV, Szawka RE, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline involvement in the negative-feedback effects of ovarian steroids on luteinising hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2009;21(10):805-12.
19. Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J Neuroendocrinol* 2009;21(7):629-39.
20. Ansonoff MA, Etgen AM. Receptor phosphorylation mediates estradiol reduction of alpha2-adrenoceptor coupling to G protein in the hypothalamus of female rats. *Endocrine* 2001;14(2):165-74.
21. Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Csányi A, Tiszai Z, Borsodi A, et al. The effects of estrogen on the α2-adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro. *Croat Med J* 2016;57(2):100-9.
22. Itoh MT, Ishizuka B. Alpha1-adrenergic receptor in rat ovary: presence and localization. *Mol Cell Endocrinol* 2005;240(1-2):58-63.
23. Kotwica J. Role of the noradrenergic system in the secretory function of the corpus luteum. *J Physiol Pharmacol* 1992;43(4 Suppl 1):131-42.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2020; Vol. 78, No. 3: 121-129 Original Article

Evaluation of gene expression of three adrenergic receptors in infertile women with poor ovarian response, candidate for IVF

Farideh Zafari Zangeneh Ph.D.[1*]
Mohammad Mehdi Naghizadeh Ph.D. student[2]
Maryam Bagheri Ph.D. Student[3]
Masoumeh Dehghan Ph.D.[4]

1- Reproductive Health Research Center of Vali-e-Asr, Vali-e-Asr2 Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Nonproliferative Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
3- Department of Reproductive Health, School of Nursing and Midwifery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- IVF Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Reproductive Health Research Center of Vali-e-Asr., First Floor, Vali-e-Asr Hospital 2, Imam Khomeini Hospital, Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66581616
E-mail: zangeneh14@gmail.com

Abstract

Received: 21 Jan. 2020 Revised: 28 Jan. 2020 Accepted: 13 Jun. 2020 Available online: 21 Jun. 2020

Background: Most studies show that 9 to 24% of people who are in in vitro fertilization (IVF) cycles are women who respond poorly to ovarian stimulation. Women with poor ovarian response (POR) are a group of infertile patients whose ovarian reserve, ovarian response to medication, and the quality of ovum are declining. Therefore, the number of female cycles, the number of fetuses from the oocyte and the rate of pregnancy in these women is reduced. The purpose of this study was to investigate the expression of three adrenoceptor receptor genes in the cumulus cells of women with poor ovarian response in culture medium.

Methods: This case-control study was conducted in two groups: study (POR) and control (oocyte donor's women) groups. POR diagnosis was performed by ESHRE Bologna criteria. After puncture of the follicles, cumulus-oocyte complex was collected and the cumulus cells (CCs) were isolated by enzyme and are counted with Neobar lamella and then were added in the culture medium. After completing the culture, RNA was extracted from cumulus cells and the RNA concentration was read by the Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Then cDNA synthesized and primers designed for ADR-α1, 2 and ADR-B2 or gene expression by real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. The research was done in Reproductive Health Research Center of Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, from April to December 2017.

Results: Comparison of the results of ADR-α1, 2 gene expressions in cumulus cells showed a significant decrease, but ADR-B2 was not significant in two groups. Correlation coefficients also showed that there are relationship between three adrenoceptors and their effects on each other.

Conclusion: Our results showed that the decreased expressions of ADR-α1, 2 probably related to activation of the sympathetic system and release of the more neurotransmitter that lead to down-regulation of ADR-α1, 2 in the cell membrane of cumulus in culture medium.

Keywords: adrenergic receptors, case-control studies, cumulus cells, gene expression, infertility, poor responder, women.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-03]