Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Investigation of the Effect of Polycystic Ovary Syndrome on the Expression of the Sirtuin-3 Gene in the Ovum of the NMRI Mice

Hanieh Jalali[1*], Mahnaz Azarnia[1], Fatemeh Kamalipour[1]

[1] Dept of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 30 May 2020
Revised: 15 June 2020
Accepted: 21 December 2021

**** Correspondence to:***
Jalali Hanieh
Dept of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Email: jalali@khu.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Increasing levels of free radicals in the ova reduce the quality of their fertilization. Investigations have revealed the elevated production of tissue and serum-free radicals in women with polycystic ovary syndrome. Sirtuin-3 is located in mitochondria and plays an important role in the deactivation of free radicals. This study aimed to investigate the expression of the Sirtuin-3 gene in the ova of polycystic ovary syndrome affected mice.

Material & Methods: Polycystic ovary syndrome was induced by the injection of estradiol valerate (40 mg/kg) in six NMRI mice (age: six weeks old; weight: 25±5); moreover, six mice were selected as a control group. Following the induction, the structure of the ovaries was examined using the histotechnique, and the serum levels of sex hormones were determined using ELISA. The ova were collected from the ovaries, and their RNA was extracted by a special kit and converted to cDNA. Real-Time PCR was performed to analyze the expression of Sirtuin-3, and the Gapdh gene was selected as an internal control.
(Ethic code: 97/6505)

Findings: In the mice with polycystic ovary syndrome, hydatid cysts were formed in the ovaries. Furthermore, serum FSH hormone levels decreased in the affected mice, while LH and testosterone levels elevated, compared to those in the control mice ($P<0.001$). The expression of Sirtuin-3 was reduced in the ova of mice with polycystic ovary syndrome, compared to that in healthy mice in the ratio of 0.18 ($P<0.05$).

Discussion & Conclusion: The result of the present study showed that the expression of the Sirtuin-3 gene was decreased in the ovum of mice with polycystic ovary syndrome. Moreover, the disrupted expression of the Sirtuin-3 in the ovum can be suggested as one of the causes of reduced quality of the ovum in patients with polycystic ovary syndrome.

Keywords: Mitochondria, Ovum, Oxidative stress, Polycystic ovarian syndrome

➢ **How to cite this paper**

Jalali H, Azarnia M, Kamalipour F. Investigation of the Effect of Polycystic Ovary Syndrome on the Expression of the Sirtuin-3 Gene in the Ovum of the NMRI Mice. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(1): 1-10.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences: Volume 30, Issue 1, 2022

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی اثر سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بر بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های نژاد NMRI

هانیه جلالی[1*]، **مهناز آذرنیا**[1]، **فاطمه کمالی‌پور**[1]

[1] گروه علوم جانوری، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰

تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۰۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

نویسنده مسئول:

هانیه جلالی

گروه علوم جانوری، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

Email: jalali@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه: افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در تخمک‌ها به کاهش کیفیت باروری آن‌ها منجر می‌شود. مطالعات نشان داده است که در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سطح رادیکال‌های آزاد بافتی و سرمی افزایش می‌یابد. Sirtuin-3در میتوکندری قرار دارد و نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند؛ بنابراین، هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بود.

مواد و روش ها: سندرم تخمدان پلی‌کیستیک توسط تزریق استرادیول والرات (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در ۶ موش نژاد NMRI با سن ۶ هفته و وزن ۵±۲۵ گرم ایجاد گردید و ۶ موش نیز به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. به دنبال القای بیماری، بافت تخمدان توسط روش هیستوتکنیک بررسی گردید و سطح سرمی هورمون‌های جنسی با استفاده از کیت مخصوص الایزا تعیین شد. تخمک‌ها از تخمدان موش‌ها جمع‌آوری گردید و RNA آن‌ها توسط کیت مخصوص استخراج و به cDNA تبدیل شد و سپس Real Time PCR برای سنجش بیان ژن Sirtuin-3 صورت گرفت و ژن Gapdh به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در تخمدان موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، کیست‌های هیداتید تشکیل گردید و سطح هورمون FSH کاهش و سطح هورمون‌های LH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P<0.001$). بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک‌های جمع‌آوری‌شده از موش‌های بیمار نسبت به موش‌های سالم، به میزان ۰/۱۸ کاهش یافت ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتیجهٔ تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک کاهش می‌یابد. بیان نادرست ژن Sirtuin-3 در تخمک می‌تواند به‌عنوان یکی از علل کاهش کیفیت باروری تخمک در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، تخمک، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، میتوکندری

استناد: جلالی، هانیه؛ آذرنیا، مهناز؛ کمالی پور، فاطمه. بررسی اثر سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بر بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های نژاد NMRI. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، فروردین ۱۴۰۱؛۳۰(۱): ۱۰-۱.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

حق‌مؤلف © نویسندگان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

مقدمه

تخمک ها به‌عنوان گامت های جنسی ماده، مخزن عظیمی از اطلاعات ژنتیکی و اندامک‌ها دارند که طی لقاح، به جنین منتقل می‌شود (۱, ۲). حفظ تخمک در بهترین شرایط بیولوژیکی و فیزیولوژیکی از عوامل بسیار مهم در موفقیت لقاح و پیشرفت مناسب جنین‌زایی است. مطالعات نشان داده که کیفیت پایین تخمک و یا آسیب به آن به تشکیل نشدن بلاستوسیست منجر خواهد شد که این امر، به‌ویژه در زنانی که از روش‌های کمک باروری استفاده می‌کنند، موضوع بسیار مهم و قابل‌توجهی است (۳).

میتوکندری ازجمله اندامک‌های مهمی است که به‌واسطهٔ مکان اصلی متابولیسم سلولی، نقش عمده‌ای در بلوغ و لقاح تخمک دارد (۴). مطالعات نشان داد که صدمه به میتوکندری به‌طور محسوسی کیفیت تخمک برای باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). استرس اکسیداتیو ازجمله عواملی است که می‌تواند به میتوکندری آسیب رساند. درواقع پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA میتوکندری به‌سبب نزدیکی که با منبع تولید رادیکال‌های آزاد یعنی زنجیرهٔ انتقال الکترون دارند، در برابر این عوامل بسیار آسیب‌پذیرند (۶). رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی با الکترون اضافی هستند و درنتیجه، وضعیت ناپایدار و واکنش‌پذیری بالایی دارند. به علت این ویژگی، این مولکول‌ها قادر به حمله به سایر مولکول‌ها هستند و درنتیجه، باعث آسیب به سلول می‌شوند (۷). استرس اکسیداتیو زمانی در بدن ایجاد می‌شود که تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، به‌عنوان عوامل غیرفعال‌کنندهٔ رادیکال‌های آزاد، در بدن مختل گردد (۸).

Sirtuinها دسته‌ای از پروتئین‌های خانوادهٔ داستیلازها هستند که در داخل سلول، در تنظیم انواع فعالیت‌های متابولیکی نقش دارند (۹). این خانواده شامل Sirtuin1-7 است که هریک از آن‌ها در داخل سلول جایگاه خاصی دارند. Sirtuin3 یکی از اعضای این خانواده است که در میتوکندری قرار گرفته و نقش مهمی در مهار اکسیداتیو استرس در سلول دارد (۱۰). Sirtuin-3 با داستیله کردن Foxo3 (Forkhead box O)، از میتوکندری در مقابل عوامل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۱). مطالعات نشان داد که مهار بیان این پروتئین در فیبروبلاست های جنینی موش به تولید بسیار فراوان رادیکال های آزاد و افزایش آسیب‌های کروموزومی در برابر عوامل اکسیداتیو استرس منجر می‌شود (۱۲).

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک یکی از بیماری‌های چندعاملی است که ۲۰–۱۵ درصد از زنان در سن باروری را در کل دنیا مبتلا کرده است (۱۳). علت قطعی و اصلی این سندرم مشخص نیست و طی آن، زنان مشکلات مختلفی نظیر ریزش مو، چاقی، آکنه و اختلال در تخمک گذاری را تجربه می‌کنند (۱۴). مطالعات نشان داد که در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سطح رادیکال های آزاد و به‌ویژه رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) افزایش می‌یابد (۱۵)؛ این افزایش می‌تواند به ایجاد بیمارهایی نظیر دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی–عروقی در زنان مبتلا منجر شود (۱۶). رادیکال‌های آزاد می‌توانند از عوامل آسیب‌رسان به تخمک باشند. مطالعات نشان داد که افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در تخمک‌های پیر به کاهش کیفیت باروری آن‌ها و همچنین اختلال در مراحل اولیهٔ تکوین جنین می‌انجامد (۱۷). میزان فیزیولوژیک رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مایع فولیکولی اووسیت برای رشد طبیعی آن‌ها ضروری است؛ اما افزایش این رادیکال‌ها در مایع فولیکولی موجب آسیب به اووسیت و کاهش نرخ باروری به‌ویژه در لقاح‌های آزمایشگاهی می‌شود (۱۸, ۱۹).

با توجه اینکه تاکنون مطالعه‌ای برای تعیین سطح بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک زنان و یا الگوهای حیوانی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک صورت نگرفته است، در مطالعهٔ حاضر، سطح بیان این ژن در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تعیین شد و با سطح بیان آن در تخمک موش‌های سالم مقایسه گردید. فرضیهٔ اصلی مطالعه این بود که بیان ژن

Sirtuin-3 در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دچار کاهش می‌شود. شناخت عملکرد این ژن طی سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، نقش مهمی در انتخاب روش‌های درمانی و دارویی کارآمد دارد.

مواد و روش ها

در این مطالعه، از موش‌های نژاد NMRI (The Naval Medical Research Institute) با سن ۶ هفته و محدودهٔ وزنی ۵±۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها در شرایط استاندارد دمایی و نور با دسترسی آزاد به آب و غذا، در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه خوارزمی نگه‌داری گردیدند. در همهٔ مراحل تحقیق، اصول اخلاق کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل هلسینکی رعایت شد و مطالعهٔ حاضر توسط شورای پژوهشی دانشگاه خوارزمی تأیید گردید (کد: ۹۷/۶۵۰۵). برای القای سندرم، ۶ موش با محدودهٔ وزنی ۲۵-۲۰ گرم جدا شدند و تحت تک تزریق استرادیول والرات با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند (۲۰). پس از طی ۲ ماه، بافت تخمدان و سرم خون برای مراحل آتی کار جمع‌آوری گردید.

برش‌برداری و رنگ‌آمیزی بافتی: بافت تخمدان پس از جمع‌آوری در فیکساتیو بوئن (شامل اسید پیکریک، فرمالین و اسید استیک گلاسیال، همه از مرک آلمان) قرار گرفت. برای آماده‌سازی بافت برای برش‌برداری، ابتدا بافت با استفاده از الکل (مرک، آلمان) با درجهٔ صعودی آب‌گیری شد و سپس برای شفاف‌سازی در تولوئن (مرک، آلمان) قرار گرفت. قالب‌گیری توسط حمام پارافین (دانش کار، ایران) انجام گردید و بافت در بلوک‌های پارافینی قرار گرفت. برش‌برداری با استفاده از دستگاه میکروتوم با ضخامت ۷ میکرون انجام شد و مقاطع روی اسلایدهایی قرار گرفتند که از قبل بسترسازی شده بودند. برای رنگ‌آمیزی بافتی، از رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین (هر دو از مرک، آلمان) استفاده گردید، بدین‌صورت که ابتدا مقاطع بافتی توسط تولوئن پارافین‌زدایی شد و سپس توسط الکل با درجات نزولی آبدهی گردید و به دنبال آن، رنگ‌آمیزی با رنگ هماتوکسیلین صورت گرفت و رنگ مازاد توسط شست‌وشو حذف شد. پس از آن، مقاطع برای رنگ‌آمیزی آب‌گیری گردید و به مدت چند دقیقه در رنگ ائوزین قرار گرفت. درنهایت، مقاطع به‌طور کامل آب‌گیری شد و با استفاده از تولوئن شفاف شده و لامل‌گذاری گردید.

بررسی سطح هورمون‌های جنسی: برای بررسی سطح هورمون‌های LH (Luteinizing hormone)، FSH (Follicle-stimulating hormone) و تستوسترون در سرم خون حیوانات سالم و مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، ابتدا حیوان با استفاده از قفسهٔ CO_2 کشته شد و سپس خون از قلب جمع‌آوری گردید. خون جمع‌آوری‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار گرفت تا لخته‌های خون شکل گیرد و سپس با استفاده از سانتریفیوژ در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سرم جداسازی و جمع‌آوری شد. سطح هورمون‌های جنسی با روش الیزا و با استفاده از کیت مخصوص شرکت پادتن‌گستر ایثار، ایران اندازه‌گیری گردید.

جمع‌آوری تخمک: برای هم‌زمانی در تخمک‌گذاری حیوانات کنترل و تجربی، از تزریق ۱۰ واحد گنادوتروپین جفتی انسان (سینتکس، آرژانتین) استفاده شد و ۴۸ ساعت پس از تزریق، تخمک‌گذاری در حیوان القا گردید. برای جمع‌آوری تخمک، ابتدا تخمدان‌های ۶ حیوان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (گروه تجربی) و ۶ حیوان سالم (گروه کنترل) به‌طور جداگانه جمع‌آوری و به ظروف قطره‌گذاری‌شدهٔ حاوی محیط کشت Human Tubal Fluid (سیگما، انگلستان) منتقل شد و تکه‌تکه گردید تا تخمک‌ها آزاد شوند؛ سپس تخمک‌های مرحلهٔ وزیکول جنسی در زیر لوپ بیولوژیکی شناسایی شد و توسط ماوس پیپت برای شست‌وشو، به محلول فسفات بافر سالین (گیبکو، انگلستان) منتقل گردید. از هر حیوان به‌طور متوسط ۲۵

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

تخمک جمع‌آوری شد و برای استخراج RNA به میکروتیوپ منتقل گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA برای بررسی بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از تخمک‌ها در گروه‌های بررسی‌شده صورت گرفت، به این صورت که ابتدا به میکروتیوپ حاوی تخمک‌ها ۳۰۰ ماکرولیتر ترایزول اضافه و به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی ۲۴ ساعت، پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد گردید و به نمونه ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. پس از ۱ دقیقه، محلول با دور (rpm) ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و سپس مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود، به‌آرامی به یک میکروتیوب منتقل شد؛ سپس ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد روی RNA شفاف ریخته و به مدت ۱ دقیقه به حالت دورانی هم زده شد. محلول به‌دست‌آمده یک شب در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس نمونه‌ها از فریزر خارج گردید و در سانتریفیوژ با دور (rpm) ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ، مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه گردید؛ سپس مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور (rpm) ۷۵۰۰ قرار گرفت. پس از آن، مایع رویی تخلیه شد و RNA در داخل میکروتیوب خشک گردید. به‌منظور حل کردن RNA، به میزان ۲۰ میکرولیتر آب مقطر ۶۰ درجه روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد و RNA استخراج‌شده تا زمان استفاده، در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از همهٔ نمونه‌های پژوهش، مراحل سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (فرمنتاز، آمریکا) انجام گرفت و سپس cDNA سنتزشده برای انجام Real Time PCR استفاده گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد، به‌طوری‌که نسبت ۲ به‌عنوان RNA خالص بدون آلودگی پروتئینی در نظر گرفته شد. غلظت RNA بر اساس فرمول زیر تعیین گردید:

۴۰× ضریب رقت × جذب در ۲۶۰ نانومتر = (نانوگرم بر میکرولیتر) RNA

انجام Real Time PCR ابتدا پرایمرها بر اساس توالی جدول شمارهٔ ۱ طراحی و سنتز شدند. اختصاصیت پرایمرها در پایگاه NCBI بررسی و بلاست گردید. حساسیت پرایمرها با استفاده از واکنش PCR سریالی با رقت‌های مختلف بررسی شد؛ سپس برای انجام Real-Time PCR، ابتدا ۱۰ میکرولیتر مستر میکس SYBR Green (ABI، آمریکا)، ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای مستقیم و معکوس و ۱۰۰ نانوگرم cDNA در میکروتیوپ مخلوط گردید و حجم محلول توسط آب DEPC به ۲۰ میکرولیتر رسید و سپس در دستگاه (ABI، آمریکا) قرار گرفت.

۴۰ سیکل برای هر چرخهٔ Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. نمودار Melting برای بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شد و به‌صورت اختصاصی،

جدول شمارهٔ ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای انجام Real Time PCR

نام ژن	توالی پرایمر	Tm (℃)	اندازهٔ آمپلیکون
Sirt3	Forward: CGGCTTTGGAGGTGGAGGAAG Reverse: GAAAAAGGGCTTGGGGTTGTGA	۶۲ ۶۱	bp ۲۴۷
GAPDH	Forward: CAACTCCCACTCTTCCACCT Reverse: GAGTTGGGATAGGGCCTCTC	۵۹ ۵۹	bp۲۰۵

برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی، برای بررسی وجود آلودگی در هر واکنش ارزیابی گردید. وجود نداشتن دایمر پرایمر و منحنی ذوب تک‌قله‌ای نشان‌دهندهٔ اختصاصیت پرایمرها و وجود نداشتن محصول اضافی طی واکنش بود. کارایی Real-Time PCR با استفاده از نرم‌افزار LinReg بررسی شد. نسبت بیان ژن‌های بررسی‌شده در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخهٔ آستانه (Thereshold Cycle: CT) و با استفاده از فرمول ($R=2^{(-(\Delta\Delta CT))}$) تعیین گردید.

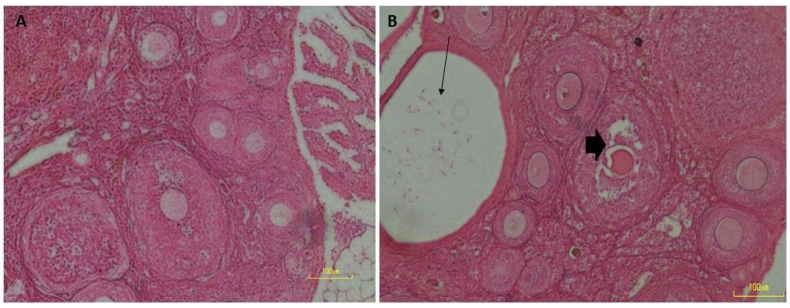
روش تحلیل آماری: از آزمون آماری ویلک در نرم‌افزار SPSS vol. 21 برای بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده و .Sig بالای ۰/۰۵ به‌عنوان توزیع نرمال داده ها پذیرفته گردید. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن، آزمون توکی برای بررسی معنی داری در سطح $P\leq0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

تغییرات بافت تخمدان در اثر تزریق داروی استرادیول والرات: بررسی بافت تخمدان نشان داد که در گروه کنترل، بافت ساختاری طبیعی به همراه انواع فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آنترال و تعدادی جسم زرد داشت که نشان‌دهندهٔ وقوع تخمک‌گذاری در حیوان بود؛ همچنین هیچ کیستی در تخمدان حیوانات سالم مشاهده نشد. در مقابل، در بافت تخمدان موش‌های مبتلا به سندرم، فولیکول‌های در حال آترزی متعددی در بافت مشاهده شد و همچنین تشکیل کیست در بافت مشهود بود (شکل شمارهٔ ۱).

تغییر سطح هورمون‌های جنسی در حیوانات مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک: بررسی آماری نشان داد، داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌های هورمونی توزیع نرمالی داشتند. مقایسهٔ سطح سرمی هورمون‌های جنسی در حیوانات مدل تخمدان پلی‌کیستیک و حیوانات سالم نشان داد که ۲ ماه پس از تزریق استرادیول والرات، سطح هورمون FSH کاهش یافت، به‌طوری‌که سطح این هورمون در گروه القای سندرم به ۱/۳۵۷±۰/۴۷۲ (نانوگرم در میلی‌لیتر) رسید، درحالی‌که در گروه سالم ۳/۰±۶۶۵/۲۳۲ (نانوگرم در میلی‌لیتر) بود. سطح هورمون‌های LH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت، به‌طوری‌که سطح هورمون LH در گروه مبتلا به سندرم ۰/۴۷۹±۰/۰۵ (نانوگرم در میلی‌لیتر) و در گروه سالم ۰/۲۳۴±۰/۰۱۳ (نانوگرم در میلی‌لیتر) بود و سطح هورمون تستوسترون در گروه مبتلا به سندرم ۱۶/۰±۲۶/۴۴۲ (نانوگرم در میلی‌لیتر) و در گروه سالم ۹/۰±۲۳۴/۹۶۶ (نانوگرم در میلی‌لیتر) بود. همهٔ تغییرات در سطح $P<0.001$ معنی‌دار است (شکل شمارهٔ ۲).

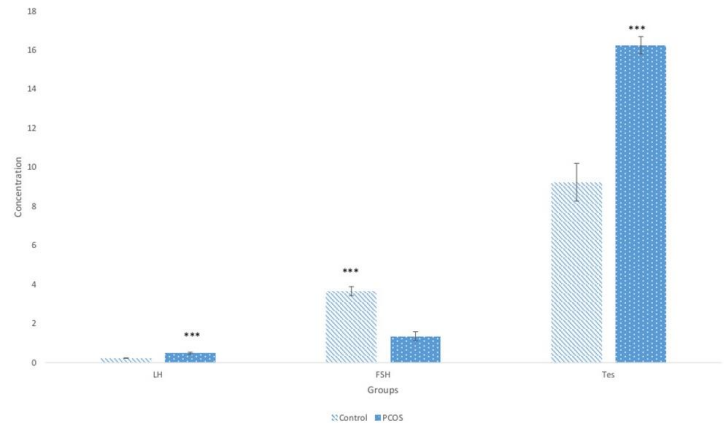
مورفولوژی تخمک‌های جمع‌آوری‌شده: تخمک‌های جمع‌آوری‌شده در زیر لوپ بیولوژیکی، از نظر ساختاری و مرحلهٔ رشدی بررسی گردید. مشاهدات نشان داد تخمک‌های آزادشده از بافت تخمدان، دسته‌ای از سلول‌های گرانولوزا را در اطراف خود داشتند؛ همچنین وجود هستهٔ بزرگ نشان‌دهندهٔ مرحلهٔ وزیکول جنسی بود



شکل شمارهٔ ۱. مقطع بافت تخمدان در دو گروه کنترل (A) و گروه سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (B). پیکان نشان‌دهندهٔ کیست و سرپیکان نشان‌دهندهٔ فولیکول در حال آترزی در گروه مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک است. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین؛ بزرگنمایی تصویر ۱۰۰×.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

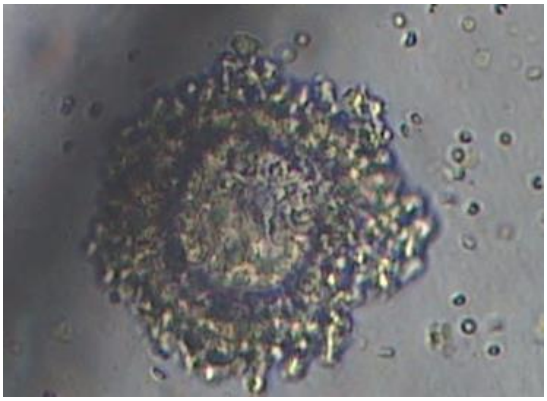
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]



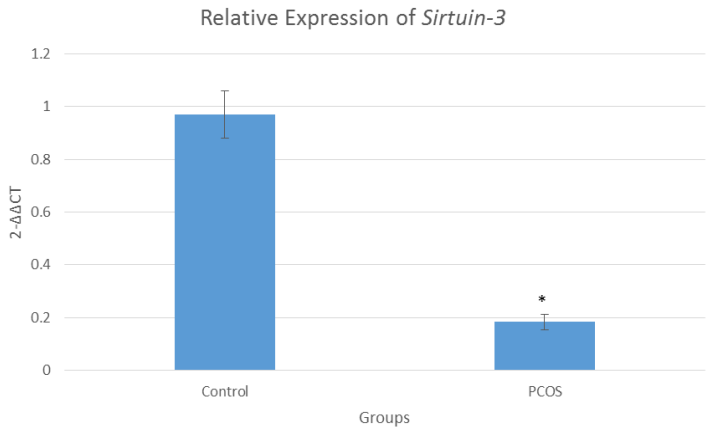
شکل شمارهٔ ۲. تغییر سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون (Tes) در سرم خون حیوانات گروه کنترل و گروه مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS). داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار (میلی‌لیتر/نانوگرم) نمایش داده‌شده‌اند (***: P<0.001).

که برای شناسایی تخمک‌ها استفاده شد (شکل شمارهٔ ۳).

کاهش بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک‌های موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک: مقایسهٔ بیان ژن Sirtuin-3 میان تخمک‌های جمع‌آوری از موش‌های سالم و مبتلا به سندرم تخمدان نشان داد که سطح بیان این ژن در تخمک حیوانات مبتلا به سندرم، به‌طور معنی‌داری، کمتر از تخمک حیوانات سالم بود، به‌طوری‌که بیان ژن در گروه مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به مقدار ۰/۱۸۴±۰/۰۵ برابر نسبت به گروه سالم کاهش یافت که از لحاظ آماری در سطح P<0.05 معنی‌دار بود (شکل شمارهٔ ۴).



شکل شمارهٔ ۳. مورفولوژی تخمک‌های جمع‌آوری‌شده در زیر لوپ بیولوژیکی. پیکان نشان‌دهندهٔ سلول‌های گرانولوزا در اطراف اووسیت است.



شکل شمارهٔ ٤. نسبت بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک‌های جمع‌آوری‌شده از گروه مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به گروه کنترل. بیان ژن در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به میزان ۰/۱۸۴±۰/۰۵ کاهش یافت. سطح معنی‌داری P<0.05 * بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در موش‌های مبتلا، با استفاده از تک تزریق استرادیول والرات ایجاد شد که تغییرات بافتی و هورمونی ایجادشده، ابتلای

حیوان به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک را تأیید کرد و مشابه با نتایج مطالعات پیشین، برای استفاده از داروی استرادیول والرات در القای سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بود (۲۰). در ادامهٔ این مطالعه، بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بررسی شد.

عوامل مختلفی نظیر ضخامت لایهٔ شفاف و شکل اووسیت، برای تعیین کیفیت تخمک و پیش‌بینی احتمال موفقیت در لقاح مدنظر قرار می‌گیرد که با توجه به متغیر بودن این عوامل، تکیه بر آن‌ها گاه با شکست مواجه می‌شود (۲۱)؛ بنابراین، توجه به وضعیت متابولیکی و ژنی تخمک برای انتخاب تخمک با کیفیت مناسب برای لقاح ضروری است. تاکنون مطالعاتی دربارهٔ پروفایل ژنی اووسیت، سلول‌های گرانولوزا و مایع فولیکولی تخمک‌های جمع‌آوری‌شده از بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و یا حیوانات نمونهٔ این بیماری صورت گرفته که همگی نشان‌دهندهٔ تغییر در سطح ژن بوده است. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۶، با مقایسهٔ پروفایل ژنی تخمک میان زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و زنان سالم در مراحل مختلف بلوغ تخمک نشان دادند که بیان ژن‌هایی نظیر PPP2R1A (Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Aalpha)، EGFR (Epithelial growth factor receptor)، TGFβ1 (Transforming growth factor beta) و غیره، در تخمک زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تغییر می‌یابد (۲۲). روت و همکاران در سال ۲۰۱۴، پروفایل میکروRNA مایع فولیکولی در تخمک زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک را با زنان سالم مقایسه کردند. آنان نشان دادند که از ۲۳۵ میکروRNA بررسی‌شده، ۲۹ میکروRNA بیان متفاوتی در مایع فولیکولی دو گروه داشت (۲۳). وود و همکاران در سال ۲۰۰۷، با استفاده از روش Microarray نشان دادند که در میان ۸۱۲۳ رونوشتی (mRNA) که در اووسیت تولید می‌شود، ۳۷۴ رونوشت بیان متفاوتی در اووسیت زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دارد که ژن‌های مؤثر مادری (maternal effect genes) و ژن‌های دخیل در آرایش کروموزومی و تقسیمات میتوزی و میوزی ازجمله مهم‌ترین ژن‌هایی بودند که در اووسیت زنان بیمار، بیان متفاوتی نسبت به اووسیت زنان سالم داشتند (۲۴). همسو با چنین یافته‌هایی، محققین در جست‌وجوی شناخت عواملی هستند که به‌عنوان تعیین‌کنندهٔ کیفیت تخمک و پیش‌بینی نرخ موفقیت در لقاح و مراحل ابتدایی جنین‌زایی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک استفاده گردد. در حال حاضر، ارتباط تغییر در بیان برخی ژن‌ها با کاهش نرخ باروری در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک شناسایی‌شده است؛ برای مثال، مطالعات فنگ و همکارانش نشان داد که غلظت بالای GDF-8 (growth differentiation factor-8) در مایع فولیکولی بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، به کاهش نرخ بارداری در این زنان منجر می‌شود (۲۵).

در مطالعهٔ حاضر نشان داده شد که بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، نسبت به موش‌های سالم کاهش داشت. کاهش بیان این ژن در نمونه حیوانات مطالعهٔ ما می‌تواند در کنار سایر عوامل شناخته‌شدهٔ آسیب‌رسان به کیفیت تخمک در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مورد توجه قرار گیرد. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که دست‌کاری ژن Sirtuin-3 در اووسیت‌های انسان به اختلال در همانندسازی DNA میتوکندری اووسیت و متعاقب آن اختلال در بلوغ تخمک منجر می‌گردد (۲۶)؛ همچنین مهار ژن Sirtuin-3 در تخمک‌های جمع‌آوری‌شده از موش و خوک به کاهش تعداد بلاستوسیست‌ها انجامید (۲۷, ۲۸). مطالعه روی سازوکارهای پیری اووسیت نشان داد که کاهش در بیان Sirtuin-3 به افزایش تولید ROS در تخمک موش منجر می‌شود و درنهایت، به نقص در مرحلهٔ لانه‌گزینی می‌انجامد (۲۹). مطالعه دربارهٔ استرس اکسیداتیو القاشده در اووسیت موش‌های مبتلا به چاقی نیز نشان داد که Sirtuin-3 احتمالاً از طریق SOD (Superoxide dismutase)، به مهار آثار زیان‌بار استرس اکسیداتیو در این موش‌ها نظیر آرایش نامنظم دوک تقسیم و تفکیک غیرمعمول

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

کروموزوم‌ها منجر می‌شود و ترکیبی نظیر ملاتونین از طریق فعال کردن این آنزیم، آثار مثبتی در بهبود این عوارض دارد (۳۰). همسو با این مطالعه، لیو و همکارانش نیز نشان دادند که داستیله شدن SOD در اثر فعالیت Sirtuin-3، نقش مهمی در حفاظت از اووسیت موش‌های مبتلا به دیابت در مقابل استرس اکسیداتیو دارد (۳۱)؛ بنابراین، با توجه به نقش پراهمیت این ژن در حفظ عملکرد صحیح تخمک، شناخت تغییرات بیان آن در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، لزوم توجه به استفاده از داروهایی را افزایش دهد که موجب حفظ بیان ژن Sirtuin-3 در تخمک می‌شوند.

استرس اکسیداتیو از عوامل مهم آسیب‌رسان در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به‌شمار می‌آید. در مطالعهٔ حاضر، کاهش بیان Sirtuin-3 به‌عنوان یکی از عوامل اصلی محافظت میتوکندری و سلول در مقابل رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر استرس اکسیداتیو، در تخمک موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مشاهده شد؛ درنتیجه، چنین به نظر می‌رسد کاهش بیان این ژن، به نبودِ محافظت از تخمک در مقابل رادیکال‌های آزاد و کاهش کیفیت تخمک‌های بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک منجر گردد. شناخت بیشتر نقش Sirtuin-3 در رشد و نمو، بلوغ و باروری تخمک در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک خواهد توانست به انتخاب داروها و روش‌های درمانی مؤثرتر کمک کند.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه خوارزمی تشکر و قدردانی می‌نماییم. نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

کد اخلاق: ۹۷/۶۵۰۵

References

1. Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. Hum Reprod Update. 2018;24:3:245-66. doi: org/10.1093/humupd/dmx040
2. Reader KL, Stanton JL, Juengel JL. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. Biology (Basel). 2017; 6: 1-3. doi:10.3390/biology6030035
3. Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. Hum Reprod Update. 2008;14:5:431-46. doi: 10.1093/humupd/dmn025
4. Chappel S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. Obstet Gynecol Int. 2013;2013:183024. doi:org/10.1155/2013/183024
5. Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. J Assist Reprod Genet. 2011;28:9:773-83. doi: 10.1007/s10815-011-9588-7
6. Lord T, Aitken RJ. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. Reproduction. 2013;146:6:R217-27. doi: 10.1530/REP-13-0111
7. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993;49:3:481-93. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625
8. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med. 2000; 108:652-9. doi: 10.1016/s0002-9343(00)00412-5
9. Nakagawa T, Guarente L. Sirtuins at a glance. J Cell Sci. 2011;124:833-8. doi: 10.1242/jcs.081067
10. Bause AS, Haigis MC. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. Exp Gerontol. 2013;48:7:634-9 doi: 10.1016/j.exger.2012.08.007.
11. Tseng AH, Shieh SS, Wang DL. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. Free Radic Biol Med. 2013;63:222-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.002
12. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. Cancer Cell. 2010; 17:1:41-52. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.023
13. Witchel SF, Oberfield SE, Pena AS. Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment With Emphasis on Adolescent Girls. J Endocr Soc. 2019. 2019; 14:3:1545-1573. doi: 10.1210/js.2019-00078
14. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16057. doi: 10.1038/nrdp.2016.57
15. Murri M, Luque-Ramirez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2013;19:3:268-88. doi: 10.1093/humupd/dms059
16. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. Oxid

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.1.1.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.1.1]

Med Cell Longev. 2016;2016:8589318. doi: 10.1155/2016/8589318

17. Sasaki H, Hamatani T, Kamijo S, Iwai M, Kobanawa M, Ogawa S, et al. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. Front Endocrinol (Lausanne). 2019; 10:811. doi.org/10.3389/fendo.2019.00811
18. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? Hum Reprod. 2006;21:9:2403-7. doi:10.1093/humrep/del156
19. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? .Reprod Bio Online. 2009;18:6:864-80. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60038-7
20. Osuka S, Nakanishi N, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, et al. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides .Reprod Med Biol. 2019;18:2:151-60. doi: 10.1002/rmb2.12262
21. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. Nat Commun. 2016; 7:1-12. doi: 10.1038/ncomms10809.
22. Liu Q, Li Y, Feng Y, Liu C, Ma J, Li Y, et al. Single-cell analysis of differences in transcriptomic profiles of oocytes and cumulus cells at GV, MI, MII stages from PCOS patients. Sci Rep. 2016; 6:1-12. doi: 10.1038/srep39638
23. Roth LW, McCallie B, Alvero R, Schoolcraft WB, Minjarez D, Katz-Jaffe MG. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. J Assist Reprod Genet. 2014;31:3:355-62. doi: 10.1007/s10815-013-0161-4
24. Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF, 3rd. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:2:705-13. doi: 10.1210/jc.2006-2123.
25. Fang L, Wang S, Li Y, Yu Y, Li Y, Yan Y, et al. High GDF-8 in follicular fluid is associated with a low pregnancy rate in IVF patients with PCOS. Reproduction. 2020; 160:11-19. doi: 10.1530/REP-20-0077
26. Zhao HC, Ding T, Ren Y, Li TJ, Li R, Fan Y, et al. Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. Hum Reprod. 2016;31:3:607-22. doi: 10.1093/humrep/dev345
27. Kwak SS, Cheong SA, Yoon JD, Jeon Y, Hyun SH . Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitors on in vitro embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Theriogenology. 2012;78:7:1597-610. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.07.006
28. Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, Di Carlo M, Santini S, Jr., D'Alessandro AM, et al. Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress and Aging. Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015:1-12. doi:org/10.1155/2015/659687
29. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K ,Amano T, et al. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. J Clin Invest. 2010; 120:8:2817-28. doi: 10.1172/JCI42020
30. Han L, Wang H, Li L, Li X, Ge J, Reiter RJ, et al. Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. J Pineal Res. 2017; 63: 1-10. doi: 10.1111/jpi.12431
31. Liu X, Zhang L, Wang P, Li X, Qiu D, Li L, et al. Sirt3-dependent deacetylation of SOD2 plays a protective role against oxidative stress in oocytes from diabetic mice. Cell Cycle. 2017;16:13:1302-8. doi: 10.1080/15384101.2017.1320004