

## بیان ژن‌های CYP19، SOCS3 و HOXA در سیستم تولیدمثلی یک مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک

مهسا نوروززاده<sup>۱</sup>، مصطفی چنگایی<sup>۲</sup>، دکتر مرضیه صالحی جهرمی<sup>۳</sup>، دکتر سمیرا رجایی<sup>۴</sup>،  
دکتر فهیمه رضضانی تهرانی<sup>۱</sup>

۱) مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۲) گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ۳) گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز زیات و غدد درون‌ریز، دانشکده تحقیقات پزشکی، دانشگاه تولید، اوهایو، آمریکا، ۴) گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه با نویسنده مسئول:** تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، پلاک ۲۳، مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران،  
دکتر فهیمه رضضانی تهرانی؛ e-mail: fah.tehrani@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** اختلال در پذیرش جنین توسط آندومتر و شکست در لانه‌گزینی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) گزارش شده است؛ لیکن سازوکارهای مولکولی موجب این اختلال نامشخص است. در این مطالعه، بیان نسبی ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدان و ژن‌های دخیل در فرآیند لانه‌گزینی؛ شامل SOCS3، HOXA9 و HOXA11، در بافت رحم موش صحرایی بالغ مبتلا به PCOS؛ نسبت به گروه شاهد (سالم) مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: در روز ۲۰ بارداری پنج میلی‌گرم تستوسترون آزاد، به صورت زیر جلدی، به موش‌های صحرایی باردار تزریق شد و موش‌های صحرایی باردار در گروه دیگر فقط حلال دریافت کردند. زاده‌های ماده‌ای که در طول زندگی جنینی خود در معرض آندروژن قرار گرفته بودند به عنوان مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS و زاده‌های ماده از گروه دیگر به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند (تعداد حیوان‌ها در هر گروه ۸ سر بود). بیان نسبی ژن‌های CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدان و ژن‌های SOCS3، HOXA9 و HOXA11 در رحم به روش Real-time PCR با استفاده از رنگ سایبر گرین اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: کاهش معنی‌داری در بیان نسبی ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدان مدل موش صحرایی PCOS نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $p=0/02$ ). هم‌چنین میزان بیان نسبی ژن‌های SOCS3 ( $p<0/001$ )، HOXA9 ( $p=0/018$ ) و HOXA11 ( $p=0/007$ ) در بافت رحم مدل موش صحرایی PCOS نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. نتیجه‌گیری: کاهش بیان ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدان و ژن‌های SOCS3، HOXA9 و HOXA11 در بافت رحم، ممکن است از سازوکارهای مولکولی زمینه‌ساز شکست لانه‌گزینی در افراد مبتلا به PCOS باشد.

**واژگان کلیدی:** CYP19، SOCS3، HOXA، لانه‌گزینی، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، موش صحرایی

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۷/۲۵ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷

### مقدمه

آندروژن‌ها، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری و مشاهده کیست‌های تخمدانی صورت می‌پذیرد.<sup>۱</sup> علاوه بر عوامل ژنتیک، مواجهه با آندروژن‌ها در دوره جنینی نیز می‌تواند زمینه‌ساز بروز PCOS در دوره‌های بعدی زندگی فرد باشد.<sup>۲</sup> اگرچه کاهش یا عدم تخمک‌گذاری در بیماران مبتلا به PCOS از دلایل اصلی کاهش یا عدم باروری در این بیماران

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)<sup>۱</sup> از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان در سنین تولیدمثل می‌باشد.<sup>۱،۲</sup> تشخیص PCOS بر اساس وجود سطوح بالای

لانه‌گزینی و نفوذپذیری رحم در طول دوره بارداری در این مدل حیوانی می‌باشد.

همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، با توجه به نقش هورمون‌های استروئیدی جنسی داخل فولیکولی (E2/T)، سیتوکین‌ها و عوامل رونویسی در فرآیند لانه‌گزینی و به دنبال آن بارداری، هدف ما در مطالعه حاضر بررسی بیان نسبی ژن CYP19<sup>vii</sup> (ژن تولیدکننده آنزیم آروماتاز که آندروژن را به استروژن تبدیل می‌کند) در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی و ژن‌های SOCS3، HOXA9 و HOXA11 (از عوامل رونویسی درگیر در لانه‌گزینی) در رحم مدل موش صحرایی بالغ مبتلا به PCOS نسبت به گروه شاهد (سالم) می‌باشد. تاکنون مطالعه زیادی در رابطه با بیان این ژن‌ها در PCOS انجام نشده است بنابراین ارزیابی بیان این ژن‌ها ممکن است راهی برای شناسایی اساس مولکولی شکست لانه‌گزینی در افراد مبتلا به PCOS باشد.

## مواد و روش‌ها

### تأییدیه اخلاق

در مطالعه حاضر کلیه اصول و استانداردهای مراقبت و نگهداری از حیوان‌ها رعایت شده است. کمیته اخلاق پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (تهران، ایران)، این مطالعه را با کد IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1396.447 تأیید نموده است.

### نگهداری حیوانات

در این مطالعه تجربی، ۱۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار (سن ۸۵ تا ۹۵ روز و وزن ۱۸۰ تا ۱۹۰ گرم) از حیوان‌خانه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم تهیه شد.

ده سر موش صحرایی ماده هر یک قفس جداگانه به مدت ۲۴ ساعت، در شرایط استاندارد (دما ۲۲±۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۵-۴۵٪ با چرخه‌های نوری- تاریکی ۱۲ ساعته)، در کنار موش صحرایی نر نگهداری شدند. روز اول بارداری برای ۱۰ سر موش صحرایی با مشاهده پلاگ واژینال مشخص شد.

است،<sup>۹</sup> اختلال در پذیرش آندومتر، سقط خود به خود و شکست لانه‌گزینی در زنان مبتلا به این سندرم<sup>۶،۷</sup> نیز از عوامل و سازوکارهای اساسی موجب اختلال باروری در زنان مبتلا به PCOS می‌باشد که کمتر مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است.

فرایند لانه‌گزینی توسط عوامل سلولی، مولکولی و هورمونی تنظیم می‌شود و اختلال هر یک از این عوامل می‌تواند منجر به شکست لانه‌گزینی گردد.<sup>۸</sup> نتایج یک مطالعه نشان داده است که سطوح داخل فولیکولی E2/T<sup>i</sup> با میزان موفقیت لانه‌گزینی مرتبط است.<sup>۹</sup> بنابراین تغییر در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های موثر در مسیر استروئیدزایی می‌تواند بر میزان لانه‌گزینی تأثیر بگذارد. همچنین؛ شواهد نشان می‌دهد که سیتوکین‌های دخیل در پاسخ‌های ایمنی و عوامل رونویسی؛ مانند پروتئین هومئوباکس (HOXA)،<sup>ii</sup> نقش مهمی در لانه‌گزینی و برقراری بارداری ایفا می‌کنند.<sup>۱۰-۱۲</sup> علاوه بر این در برخی مطالعات بر نقش ژن کدکننده پروتئین سرکوبگر پیام‌رسانی سیتوکین ۳ (SOCS3)<sup>iii</sup> در روند لانه‌گزینی جنینی در آندومتر رحم اشاره شده است.<sup>۱۳،۱۴</sup>

به دلیل محدودیت‌های اخلاقی و عدم امکان انجام برخی آزمایش‌ها در انسان، مدل‌های حیوانی PCOS به ابزار مناسبی جهت شناسایی و درک اساس مولکولی این بیماری و اختلالات آن بدل شده‌اند. ما در پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم موفق شده‌ایم مدلی از موش صحرایی مبتلا به PCOS را به واسطه مواجهه با مقادیر زیاد تستوسترون در دوره جنینی تولید کنیم. این مدل حیوانی علائمی مشابه با علائم بیماری در انسان را نمایان می‌سازد. این علائم عبارتند از: افزایش سطوح تستوسترون، افزایش سطوح هورمون LH<sup>iv</sup>، اختلال در تخمک‌گذاری، کیست‌های تخمدان، مقاومت به انسولین، پرفشاری خون و اختلال در میکروبیوتای روده.<sup>۱۵-۱۷</sup> و همچنین در این مدل کاهش بیان ژن برخی از عوامل ایمنی و عوامل رونویسی؛ مانند IL-10<sup>v</sup>، IL-11 و HOXA10<sup>vi</sup> در بافت رحم، و کاهش قابل توجه در تعداد مکان‌های لانه‌گزینی در زمان بارداری مشاهده شده است.<sup>۱۸،۱۹</sup> این یافته‌ها که نشان‌دهنده نقص در مراحل

i-Estradiol/Testosterone

ii-Homeobox A

iii-Suppressor of Cytokine Signaling 3

iv-Luteinizing Hormone

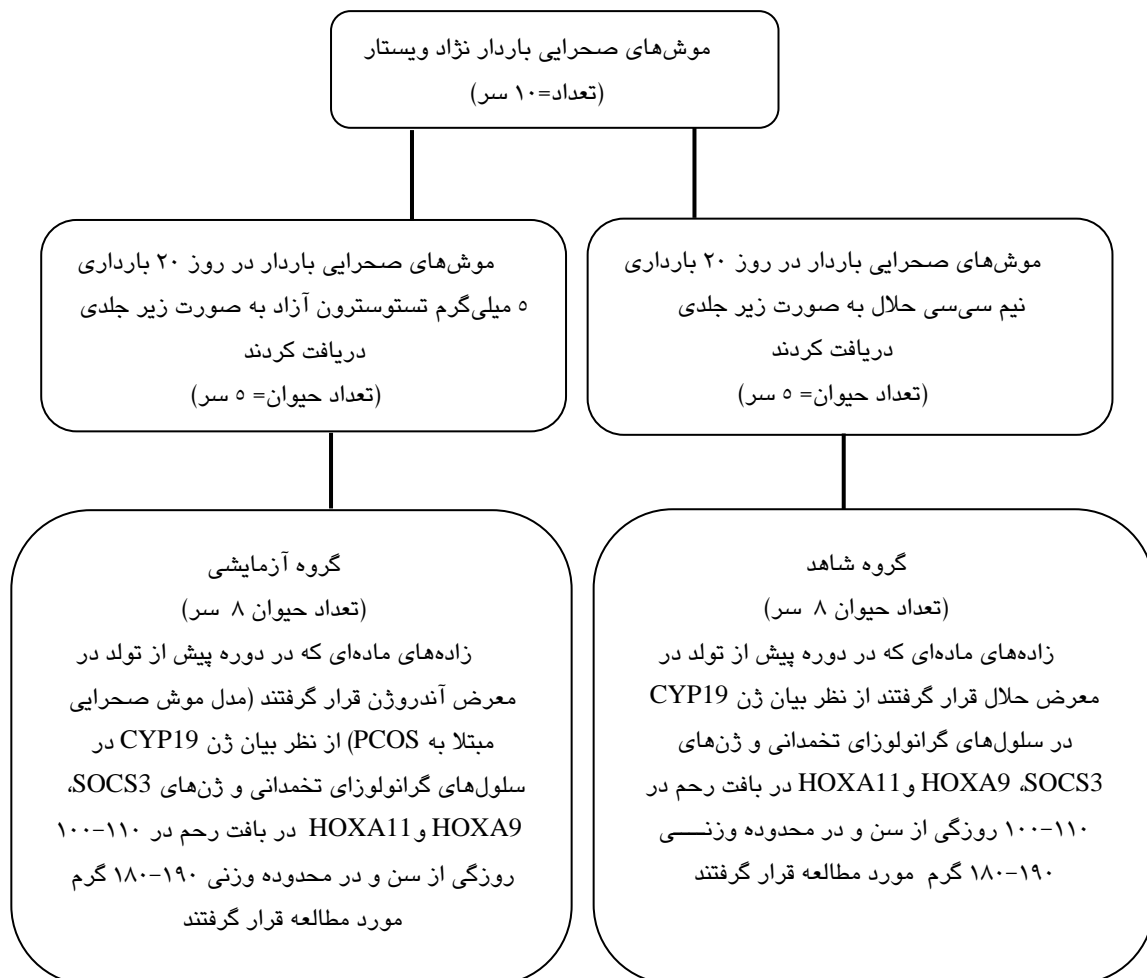
v-Interleukin 10

vi-Homeobox A10

## القای PCOS در موش صحرایی

ده سر موش صحرایی باردار به ۲ گروه تقسیم شدند. در یک گروه؛ که شامل ۵ سر موش صحرایی باردار بود، به هر یک از حیوانات باردار در روز ۲۰ بارداری پنج میلی‌گرم تستوسترون آزاد (۵ میلی‌گرم، T1500؛ سیگما، اشتاینهایم؛ آلمان) به صورت زیر جلدی تزریق شد و در گروه دیگر نیز که شامل ۵ سر حیوان باردار بود به هر یک از حیوانات باردار در روز ۲۰ بارداری فقط حلال (۵۰۰ میکرولیتر روغن کنجد و بنزیل بنزوات) تزریق شد.<sup>۱۰</sup> زاده‌های ماده‌ای که در دوره جنینی خود در معرض آندروژن (تستوسترون) قرار گرفته بودند به عنوان مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS و

زاده‌های ماده‌ای که در دوره جنینی مواجهه با آندروژن نداشتند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. حجم نمونه بر اساس فرمول تعیین شد.<sup>۲۰</sup> بیان نسبی ژن *CYP19* در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی، و بیان نسبی ژن‌های *SOCS3*، *HOXA9* و *HOXA11* در بافت آندومتر رحم در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS (تعداد حیوان مدل PCOS=۸ سر) و حیوانات گروه شاهد (تعداد حیوان شاهد=۸ سر)، در دوران بزرگسالی (در ۱۱۰-۱۰۰ روزگی از سن) و در محدوده وزنی ۱۹۰-۱۸۰ گرم، اندازه‌گیری شد (شکل ۱، گروه‌بندی حیوانات را نشان می‌دهد).



شکل ۱- نمودار گروه‌بندی مطالعه

حلال: روغن کنجد و بنزیل بنزوات به نسبت ۴:۱، PCOS: سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، *CYP19*: Cytochrome P450 family 19، *HOXA9*: Homeobox A9، *HOXA11*: Homeobox A11، *SOCS3*: Suppressor of cytokine signaling 3

## جداسازی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی و جداسازی رحم

در فاز استروس<sup>i</sup> از چرخه استروس (سیکل جنسی)،<sup>۲۱</sup> به موش‌های صحرایی پنتوباربتال سدیم<sup>ii</sup> (۶۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از بیهوشی، حیوانات با سوراخ کردن قلبشان کشته شدند و تخمدان‌ها و شاخ‌های رحم از موش‌های صحرایی مبتلا و شاهد برداشته شد. تخمدان‌ها و شاخ‌های رحم در بافر فسفات سالین سرد (pH=۷/۴) در ظرف حاوی یخ قرار گرفتند. بافت چربی اطراف تخمدان‌ها و رحم (نمونه‌های ۵×۵ میلی‌متر، ۵۰ میلی‌گرم از بافت رحم هر حیوان برای بررسی‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت) برداشته شد و به محیط کشت (RPMI 1640) در ظروف پتری منتقل شد. پس از جداسازی فولیکول‌های تخمدانی با استفاده از میکروفورسیس<sup>iii</sup>، فولیکول‌ها با یک سوزن ظریف سوراخ شدند و تحت فشار قرار گرفتند تا مایع فولیکولی حاوی سلول‌های گرانولوزا و تخمک آزاد شود. با استفاده از پیپت دهانی و پیپتاژ مکرر، مجموعه تخمک و سلول‌های گرانولوزای اطراف آن از هم جدا شده و تخمک خارج شد. سوسپانسیون سلولی؛ حاوی سلول‌های گرانولوزا و مایع فولیکولی، به یک لوله فالکون عاری از آنزیم RNase منتقل و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت چرخشی ۱۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و سلول‌های گرانولوزا جدا شدند. سلول‌های گرانولوزای جدا شده و هم‌چنین نمونه‌های رحمی همگن شده به لوله‌های سترون عاری از DNase/RNase منتقل شدند و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، تا زمان استخراج RNA، نگهداری شدند.

## استخراج RNA، ساخت cDNA و سنجش بیان ژن با استفاده از Real-time polymerase chain reaction

سلول‌های گرانولوزا و بافت رحم در محلول تریزول<sup>iv</sup> (یکتا تجهیز، ایران) همگن شدند و RNA تام طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. غلظت و خلوص RNA با نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ<sup>v</sup> (ترموفیشر<sup>vi</sup>، آمریکا) بررسی شد. RNA تام

استخراج شده در ابتدا با آنزیم DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) تیمار گردید. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز، ایران) و استفاده از پرایمر هگزامر تصادفی و الیگو-dT طبق دستورالعمل سازنده، ساخته شد. به منظور اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های HOXA11، HOXA9، SOCS3، CYP19 در سلول‌های گرانولوزا و رحم، Real-time qPCR در دستگاه اپلاید بیو سیستم<sup>vii</sup> (آمریکا) و با استفاده از رنگ سایبر گرین (امپلیکون<sup>viii</sup>، دانمارک) و پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) انجام شد. در جدول ۲ شرایط چرخه‌های حرارتی برای بررسی بیان ژن‌های مورد نظر ذکر شده است. از منحنی ذوب جهت اطمینان برای عدم تکثیر محصول غیر اختصاصی و دایمر پرایمر استفاده شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از ژن بتا-۲ میکروگلوبولین<sup>ix</sup> به عنوان ژن مرجع و استفاده از روش لیواک<sup>x</sup> محاسبه گردید.<sup>۱۸،۲۲</sup>

### جدول ۱- توالی پرایمرها

نام ژن	توالی ۵' به ۳'
<b>CYP19</b>	F: CAGAGTATCCGGAGGTGGAA - R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT Tm=58/AN=NM_017085.3/Product length=130
<b>HOXA9</b>	F: ATGCTTGTGGTTCTCTCCAG R: GAGCGAGCATGTAGCCAGTT Tm=60/AN= NM_001401868.1/Product length=145
<b>HOXA11</b>	F: GGCCACACTGAGGACAAGG R: AAGAACTCTCGCTCCAGCTC Tm=60/AN=NM_001129878.1/Product length=104
<b>SOCS3</b>	F: CTTTACCACCGACGGAACCT R: CCGTTGACAGTCTTCCGACA Tm=59/AN=NM_053566.1/Product length=187

F: Forward primer, R: Reverse primer, **CYP19**: Cytochrome P450 family 19, **HOXA9**: Homeobox A9, **HOXA11**: Homeobox A11, **SOCS3**: Suppressor of cytokine signaling 3, **Tm**: Melting Temperature, **AN**: Accession Number

vi-Thermo Fisher  
vii-Applied Biosystems  
viii-Ampliqon  
ix-Beta 2 Microglobulin  
x-Livak

i-Estrus  
ii-Pentobarbital Sodium  
iii-Micro Forceps  
iv-TRIZOL  
v-NanoDrop

جدول ۲- زمان بندی برای PCR

تعداد چرخه حرارتی	زمان	دما (سانتی‌گراد)	فرایند مولکولی
۱	۳ دقیقه	۹۴	فعال‌سازی اولیه
۴۰	۱۰ ثانیه	۹۵	واسرشت
	۱۰ ثانیه	۵۸	اتصال
	۲۰ ثانیه	۷۰	تکثیر

## یافته‌ها

چرخه‌های استروس و فاصله آنوژنیال<sup>ii</sup>

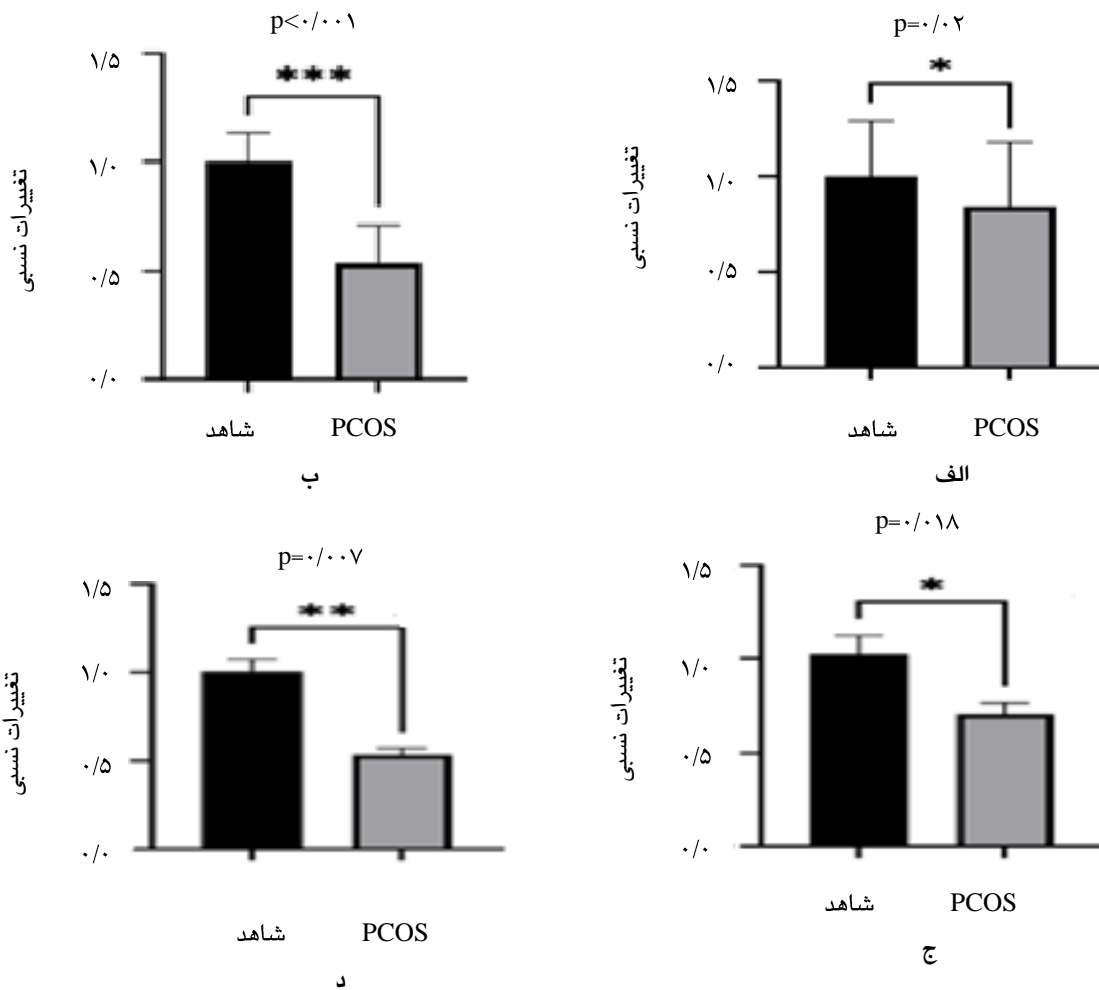
چرخه‌های استروس (چرخه‌های جنسی) مختل شده و افزایش فاصله آنوژنیال به عنوان دو شاخص برای تأیید مجدد بروز PCOS در موش صحرایی در نظر گرفته شد (داده‌ها نشان داده نشده است).

## بیان ژن CYP19 (آروماتاز) در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدان

بیان نسبی ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدان در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS و حیوان‌های گروه شاهد در شکل ۲ نشان داده شده است.

## تحلیل آماری

به منظور بررسی نرمال بودن توزیع متغیرهای پیوسته از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف<sup>i</sup> استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) ارائه شدند. برای مقایسه نتایج بین موش‌های صحرایی PCOS و شاهد از آزمون t-Student استفاده شد (تعداد حیوان در هر گروه ۸ سر). نرم‌افزار Prism نسخه ۸/۰ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودار استفاده شد. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.



شکل ۲- بیان نسبی ژن‌ها

(الف) بیان نسبی ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدانی مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS (سندرم تخمدان پلی‌کیستیک) در مقایسه با حیوان‌های گروه شاهد، (ب) بیان نسبی ژن SOCS3 در بافت رحم مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با حیوان‌های گروه شاهد، (ج) بیان نسبی ژن HOXA9 در بافت رحم مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با حیوان‌های گروه شاهد، (د) بیان نسبی ژن HOXA11 در بافت رحم مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با حیوان‌های گروه شاهد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار، تعداد حیوان در هر گروه ۸ سر.

i-Kolmogorov-Smirnov Test

ii-Anogenital Distance (AGD)

می‌باشد.<sup>۲۴،۲۵</sup> ژن CYP19 آنزیم P450-آروماتاز را کد می‌کند که آنزیمی کلیدی در مسیر تولید استروئیدها و متعاقباً فولیکول‌زایی و تخمک‌گذاری می‌باشد. در زنانی که در سنین تولیدمثل و متأثر از اثرات تنظیمی گنادوتروپین‌ها (LH و FSH<sup>ii</sup>) می‌باشند، آندروژن تولید شده توسط سلول‌های تکای<sup>iii</sup> تخمدان توسط آنزیم آروماتاز، که در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های در حال رشد و سلول‌های جسم زرد قرار دارد، به استروژن تبدیل می‌شوند.<sup>۲۶</sup> بنابراین کاهش بیان ژن یا فعالیت این آنزیم با افزایش سطح تستوسترون همراه می‌شود.<sup>۲۷</sup> این وضعیت سبب بروز هیپرآندروژنیسم<sup>iv</sup> به عنوان یکی از مشخصه‌های اصلی PCOS می‌گردد. هم‌چنین به دلیل ناکافی بودن مقادیر استروژن برای تنظیم بلوغ فولیکول و تخمک، اختلال در رشد فولیکول‌ها و متعاقباً عدم تخمک‌گذاری مزمن بروز خواهد کرد.<sup>۲۸</sup> در برخی از مطالعات، کاهش سطوح mRNA آروماتاز، کاهش فعالیت آنزیم آروماتاز و کاهش تولید E2 در فولیکول‌های با اندازه‌های مختلف؛ در بیماران مبتلا به PCOS گزارش شده است.<sup>۲۹،۳۰</sup> علاوه بر این، نشان داده شده است که کاهش تولید استروژن به دنبال کاهش بیان آنزیم آروماتاز ممکن است محیط داخل فولیکولی را مختل و به رشد و بلوغ تخمک آسیب رسانده و کیفیت تخمک کاهش یابد.<sup>۲۸،۲۹</sup> بنابراین، سطح هورمون‌های جنسی در مایع فولیکولی نقش مهمی در رشد و کیفیت تخمک دارد. نتایج یک مطالعه که بر روی بیماران مبتلا به PCOS انجام شده است نشان داد که تغییرات در اجزای مایع فولیکولی می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تخمک و پیامدهای بارداری، مانند شکست لانه‌گزینی شود.<sup>۳۱</sup> بین نسبت داخل فولیکولی E2/T با میزان لانه‌گزینی و بارداری همبستگی مثبتی مشاهده شده است. علاوه بر این، غلظت‌های E2 و E2/T داخل فولیکولی به طور مثبت در میزان لانه‌گزینی نقش دارند، در حالی که یک محیط داخل فولیکولی آندروژنیک می‌تواند منجر به تحلیل فولیکولی<sup>v</sup> شود. بنابراین، نسبت E2/T را می‌توان به عنوان یک پیش‌گویی‌کننده برای میزان موفقیت‌آمیز بودن لانه‌گزینی و بارداری در نظر گرفت.<sup>۳۲</sup>

در مطالعه حاضر کاهش بیان ژن عوامل رونویسی Y شامل HOXA9 و HOXA11 در مدل موش صحرایی مبتلا

کاهش قابل توجهی در سطوح بیان نسبی ژن CYP19 در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی شاهد مشاهده شد. در مدل PCOS بیان نسبی ژن CYP19 برابر با  $0.74 \pm 0.08$  و در حیوان‌های گروه شاهد برابر با  $1.00 \pm 0.02$  ( $p=0.02$ ) می‌باشد (شکل ۲، الف).

**بیان ژن‌های SOCS3، HOXA9 و HOXA11 در بافت رحم**  
بیان نسبی ژن SOCS3 در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS ( $0.52 \pm 0.02$ ) در مقایسه با حیوانات گروه شاهد ( $1.00 \pm 0.13$ ) به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ( $p<0.001$ ) (شکل ۲، ب)، بیان نسبی ژن HOXA9 نیز در موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS برابر با  $0.7 \pm 0.08$  بود که در مقایسه با موش‌های گروه شاهد ( $1.00 \pm 0.1$ ) به طور معنی‌داری کاهش داشت ( $p=0.018$ ) (شکل ۲، ج). در مورد ژن HOXA11 بیان نسبی در مدل موش‌های مبتلا به PCOS برابر با  $0.51 \pm 0.09$  و در موش‌های گروه شاهد برابر با  $1.00 \pm 0.1$  بود که نماینده کاهش معنی‌دار بیان می‌باشد ( $p=0.007$ ) (شکل ۲، د).

## بحث

در مطالعه حاضر، کاهش بیان ژن آروماتاز (ژن CYP19) در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی و هم‌چنین کاهش بیان ژن‌های SOCS3، HOXA9 و HOXA11 در بافت رحم مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS مشاهده شد. این کاهش بیان ژن‌ها ممکن است در شکست لانه‌گزینی در بیماران مبتلا به PCOS نقش داشته باشد. لانه‌گزینی یک مرحله حیاتی در بارداری موفق است. "پنجره لانه‌گزینی" یک بازه زمانی کوتاه است که بلاستوسیست<sup>۱</sup> بر روی حالت پذیرنده رحم قرار می‌گیرد.<sup>۳۳</sup> هر گونه اختلال در "پنجره لانه‌گزینی" با شکست یا نقص در فرآیند لانه‌گزینی همراه خواهد شد و لانه‌گزینی غیر طبیعی می‌تواند منجر به طیفی از اثرات منفی شود که در نهایت منجر به پیامدهای حاملگی ضعیف خواهد شد.<sup>۳۳</sup> عوامل زیادی مانند هورمون‌ها، عوامل رشد، سیتوکین‌ها، کیفیت تخمک، عوامل رونویسی و مولکول‌های چسبندگی در فرآیند لانه‌گزینی نقش دارند.

در توافق با مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر، کاهش بیان ژن CYP19 در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS مشاهده شد که با نتایج حاصل از مطالعات انسانی سازگار

ii-Follicle Stimulating Hormone

iii-Theca cells

iv-Hyperandrogenism

v-Follicle Atresia

i-Blastocyst

گروه شاهد مشاهده کردیم. SOCS3 که متعلق به خانواده SOCS است، یک پروتئین درون سلولی است که پیام‌رسانی سیتوکین را سرکوب می‌کند و نقش مهمی در پاسخ‌های التهابی ایفا می‌کند. نتایج یک پژوهش نشان داده است که کاهش پیام‌رسانی SOCS3 ممکن است با افزایش پاسخ‌های التهابی در تروفوبلاست<sup>ii</sup> های جفت همراه باشد که منجر به پره‌اکلامپسی<sup>iii</sup> می‌شود. در یک مطالعه نشان داده شده است که بیان بیش از حد SOCS3 در کشت سلولی JEG-3 جفت، باعث افزایش ترشح IL-10 (سیتوکین ضد التهابی) که محافظ بارداری است می‌شود.<sup>۳۹</sup> علاوه بر این، مطالعه دیگری نشان داد که SOCS3 در تنظیم اثرات سایتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی<sup>iv</sup> و بیان IL-10 نقش دارد و خاموش کردن SOCS3 باعث افزایش سایتوتوکسیسیته در کشت سلولی NK-92 می‌شود و<sup>۴۰</sup> بنابراین تعادل در بیان ژن SOCS3 اثرات سایتوتوکسیک و بیان IL-10 را در سلول‌های دسیدوا کنترل می‌کند.

#### نقاط قوت و ضعف مطالعه

بر اساس دانش ما، این مطالعه یکی از اولین مطالعه‌هایی است که بیان ژن‌های HOXA9, SOCS3, CYP19 را در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS القاء شده توسط مواجهه با آندروژن در دوره پیش از تولد را بررسی می‌کند. این مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS ممکن است ما را در درک سازوکارهای زمینه‌ساز شکست لانه‌گزینی در بیماران مبتلا به PCOS و شناسایی اهداف درمانی مناسب کمک نماید. با این حال، محدودیت اصلی مطالعه ما کمبود تحقیقات مشابه در این مدل حیوانی PCOS می‌باشد که مقایسه نتایج ما را دشوار ساخته است.

#### نتیجه‌گیری

کاهش بیان ژن CYP19 در سلول‌های گرانولوزای تخمدان و ژن‌های SOCS3, HOXA9 و HOXA11 در بافت رحم ممکن است یکی از سازوکارهای مولکولی زمینه‌ساز شکست لانه‌گزینی در وضعیت PCOS باشد. با این حال، تحقیقات بیشتر برای تایید و گسترش یافته‌های ما ضروری است. این مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS ممکن است به درک بهتر ما از تکامل PCOS و اختلالات مرتبط کمک کند، و

به PCOS نسبت به موش‌های شاهد مشاهده شد. مطالعات حیوانی و انسانی شواهدی ارائه کرده‌اند که عوامل رونویسی HOX نقش مهمی در تکامل رحم و لانه‌گزینی جنین دارند.<sup>۱۱،۳۰</sup> افزایش بیان ژن‌های HOXA9 و HOXA11 در طول فاز ترشخی چرخه قاعدگی و لانه‌گزینی نشان می‌دهد که محصولات این ژن‌ها ممکن است برای پذیرش آندومتر، لانه‌گزینی بلاستوسیست، و نفوذ جنین به داخل رحم حیاتی باشند.<sup>۱۱،۳۱</sup> از سوی دیگر، بیان کمتر HOXA11 در بیماران مبتلا به نقص لانه‌گزینی گزارش شده است.<sup>۳۲</sup> نقش مهم HOXA11 در فرآیند نفوذ جنین به داخل رحم در حیوانات (موش) نیز گزارش شده است.<sup>۱۱،۳۲</sup> نتایج یک مطالعه نشان داد که جلوگیری از بیان ژن‌های HOXA9, HOXA10 و HOXA11 منجر به کاهش تعداد زاده‌ها می‌شود،<sup>۳۱</sup> که می‌تواند نشانه‌ای از ضروری بودن محصولات آن‌ها برای پذیرش آندومتر نسبت به لانه‌گزینی بلاستوسیست باشد. مطالعات حیوانی و انسانی نشان داده‌اند که هورمون‌های استروئیدی جنسی، از جمله E2، پروژسترون (P4) و آندروژن‌ها، بیان ژن‌های HOX را تنظیم می‌کنند.<sup>۱۰،۳۳</sup> علاوه بر این، یک مطالعه انسانی نشان داد که مواجهه با دی‌اتیل‌استیل‌بسترول<sup>۱</sup> در دوره پیش از تولد ممکن است منجر به تغییرات دائمی در بیان ژن‌های HOXA9-11 در دوران بزرگسالی شود.<sup>۲۴،۳۰</sup> بنابراین، در مطالعه حاضر کاهش بیان ژن HOXA در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS ممکن است به دلیل اختلالات هورمون‌های استروئیدی جنسی در طول زندگی بزرگسالی یا قرار گرفتن در معرض آندروژن اضافی در زندگی جنینی باشد. با این حال، برای تأیید این فرضیه، تحقیقات بیشتری لازم است.

چندین سیتوکین در نفوذ جنین و تروفوبلاست به داخل بافت آندومتر رحم و لانه‌گزینی جنین نقش دارند.<sup>۳۶،۳۷</sup> ایجاد برهمکنش‌های جنین - مادر و تنظیم پاسخ ایمنی موضعی در محافظت از جنین در برابر دستگاه ایمنی مادر بسیار مهم است. در مراحل اولیه لانه‌گزینی جنین، واکنش‌های التهابی باعث افزایش عروق و تهاجم جفت می‌شوند. با این حال، این التهاب به سمت یک محیط ضدالتهابی برای جلوگیری از پس زدن جنین در حال رشد تغییر می‌کند.<sup>۳۸</sup> در مطالعه حاضر، ما کاهش قابل توجهی را در بیان ژن SOCS3 در بافت رحم مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS نسبت به حیوان‌های

ii-Trophoblast

iii-Preeclampsia

iv-Natural Killer (NK) Cells

i-Diethylstilbestrol

۱۲۲۶۲-۶ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران انجام شد.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در رابطه با این مطالعه، انتشار مقاله و اسامی نویسندگان وجود ندارد.

هم‌چنین اطلاعاتی را برای پیشگیری یا درمان ناباروری ناشی از نقص لانه‌گزینی ارائه دهد.

**سپاسگزاری:** از پروفسور مهدی هدایتی به جهت تأمین تجهیزات آزمایشگاهی تشکر می‌نماییم. این مطالعه با کمک گرنت شماره

## References






- Sadeghi HM, Adeli I. Polycystic Ovary Syndrome: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Management, and Drug Repurposing. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 583.
- Skiba MA, Islam RM, Bell RJ, Davis SR. Understanding variation in prevalence estimates of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2018; 24: 694-709.
- Christ JP, Cedars MI. Current Guidelines for Diagnosing PCOS. *Diagnostics (Basel)* 2023; 13: 1113.
- Filippou P, Homburg R. Is foetal hyperexposure to androgens a cause of PCOS? *Hum Reprod Update* 2017; 23: 421-32.
- Dennett CC, Simon J. The role of polycystic ovary syndrome in reproductive and metabolic health: overview and approaches for treatment. *Diabetes Spectr* 2015; 28: 116-20.
- El-Sayed KMA, El-fattah A, Taha A, Saeed AM. Polycystic Ovary Syndrome and Spontaneous Abortion. *Al-Azhar International Medical Journal* 2022; 3: 42-7.
- Zhao J, Chen Q, Xue X. An Update on the Progress of Endometrial Receptivity in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci* 2022; 29: 2136-44.
- Su RW, Fazleabas AT. Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015; 216: 189-213.
- Mohammadi R, Arabzadeh S, Mohebbi S. Association of Ovarian Steroids in Follicular Fluid with Pregnancy Rates in Patients with or without Polycystic Ovary during in vitro Fertilization. *J Genet Resour* 2022; 8: 188-97.
- He B, Ni ZL, Kong SB, Lu JH, Wang HB. Homeobox genes for embryo implantation: From mouse to human. *Animal Model Exp Med* 2018; 1: 14-22.
- Du H, Taylor HS. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 6: a023002.
- Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity* 2018; 49: 397-412.
- Carvalho AV, Reinaud P, Forde N, Healey GD, Eozenou C, Giraud-Delville C, et al. SOCS genes expression during physiological and perturbed implantation in bovine endometrium. *Reproduction* 2014; 148: 545-57.
- Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 201514.
- Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol* 2014; 99: 792-801.
- Noroozadeh M, Ramezani Tehrani F, Sedaghat K, Godini A, Azizi F. The impact of prenatal exposure to a single dose of testosterone on insulin resistance, glucose tolerance and lipid profile of female rat's offspring in adulthood. *J Endocrinol Invest* 2015; 38: 489-95.
- Sherman SB, Sarsour N, Salehi M, Schroering A, Mell B. Prenatal androgen exposure causes hypertension and gut microbiota dysbiosis. *Gut Microbes* 2018; 9: 400-21.
- Changaei M, Javidan M, Ramezani Tehrani F, Mosaffa N, Noroozadeh M, Hosseinzadeh R, et al. Reduced expression of Il10, Stat3, Hoxa10, and Itgb3 in the embryo implantation site of rat model with prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome. *Am J Reprod Immunol* 2023; 90: e13702.
- Javidan M, Changaei M, Ramezani Tehrani F, Mosaffa N, Noroozadeh M, Hosseinzadeh R, et al. Altered expression of leukemia inhibitory factor (LIF), LIFR, gp130, and IL11 in the embryo implantation site of rat model with prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 605: 24-30.
- Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* 2013; 4: 303-6.
- Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract* 2020; 6: 5.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* 2010; 120:1004-15.
- Aghaie F, Khazali H, Hedayati M, Akbarnejad A. The Effects of Exercise on Expression of CYP19 and STAR mRNA in Steroid-Induced Polycystic Ovaries of Female Rats. *Int J Fertil Steril* 2018; 11: 298-303.
- Panghiyangani R, Soeharso P, Andrijono, Suryandari DA, Wiwoko B, Kurniati M, et al. CYP19A1 Gene Expression in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome. *J Hum Reprod Sci* 2020; 13: 100-03.
- Blakemore J, Naftolin F. Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31: 258-69.
- Chen J, Shen S, Tan Y, Xia D, Xia Y, Cao Y, et al. The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res* 2015; 8: 11.
- Rutkowska AZ, Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertil Steril* 2016; 106: 948-58.
- Soave I, Occhiali T, Assorgi C, Marci R, Caserta D. Environmental toxin exposure in polycystic ovary syndrome women and possible ovarian neoplastic repercussion. *Curr Med Res Opin* 2020; 36: 693-703.
- Cha J, Dey SK. Cadence of procreation: orchestrating embryo-uterine interactions. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 34: 56-64.
- Xu B, Geerts D, Bu Z, Ai J, Jin L, Li Y, et al. Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes. *Hum Reprod* 2014; 29: 781-90.
- Jana SK, Banerjee P, Mukherjee R, Chakravarty B, Chaudhury K. HOXA-11 mediated dysregulation of matrix



- remodeling during implantation window in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 1505-12.
33. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 2006; 27: 331-55.
34. Akbas GE, Song J, Taylor HS. A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *J Mol Biol* 2004; 340: 1013-23.
35. Ma L, Benson GV, Lim H, Dey SK, Maas RL. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 1998; 197: 141-54.
36. You Y, Stelzl P, Joseph DN, Aldo PB, Maxwell AJ, Dekel N, et al. TNF- $\alpha$  Regulated Endometrial Stroma Secretome Promotes Trophoblast Invasion. *Front Immunol* 2021; 12: 737401.
37. Dimitriadis E, Menkhorst E, Salamonsen LA, Paiva P. Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta* 2010; 31 Suppl: S99-104.
38. Ragsdale HB, Kuzawa CW. Regulation of inflammation during gestation and birth outcomes: Inflammatory cytokine balance predicts birth weight and length. *Am J Hum Biol* 2019; 31: e23245.
39. Dong Q, Fan R, Zhao S, Wang Y. Over-expression of SOCS-3 gene promotes IL-10 production by JEG-3 trophoblast cells. *Placenta* 2009; 30: 11-4.
40. Braunschweig A, Poehlmann TG, Busch S, Schleussner E, Markert UR. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS3) balance controls cytotoxicity and IL-10 expression in decidual-like natural killer cell line NK-92. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66: 329-35.

## Original Article

# Expression of CYP19, SOCS3, and HOXA Genes in the Reproductive System of a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome

Noroozadeh M<sup>1</sup> , Changaei M<sup>2</sup> , Salehi Jahromi M<sup>3</sup> , Rajaei S<sup>4</sup> , Ramezani Tehrani F<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, Heritage College of Osteopathic Medicine, Ohio University, OH, USA. <sup>4</sup>Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.

e-mail: [fah.tehrani@gmail.com](mailto:fah.tehrani@gmail.com)

Received: 17/10/2023 Accepted: 17/01/2024

### Abstract

**Introduction:** Impaired endometrial receptivity and implantation failure have been reported in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). However, the molecular mechanisms underlying impaired implantation in women with PCOS remain unclear. In this study, the relative expression of the CYP19 gene in ovarian granulosa cells (GCs), as well as SOCS3, HOXA9, and HOXA11 genes in the uterine tissue (genes involved in the implantation process) were examined in the adult rat model of PCOS compared to controls. **Materials and Methods:** Five milligrams of free testosterone was subcutaneously injected into pregnant rats on the 20th day of pregnancy, and pregnant rats in the other group only received solvent. Female offspring who were exposed to androgen during their fetal life were considered as a rat model of PCOS, and female offspring from the other group were considered as the control group (n=8 in each group). The relative expression of the CYP19 gene in ovarian GCs and SOCS3, HOXA9, and HOXA11 genes in the uterus were measured using SYBR-Green real-time PCR. **Results:** A significant decrease in the relative expression of the CYP19 gene was observed in the ovarian GCs of the rat model of PCOS compared to controls (p=0.02). In addition, the relative expression of SOCS3 (p<0/001), HOXA9 (p=0.018), and HOXA11 (p=0.007) genes significantly decreased in the uterine tissue of PCOS rats compared to the controls. **Conclusion:** Reduced expression of the CYP19 gene in ovarian GCs, SOCS3, HOXA9, and HOXA11 in the uterine tissue may be one of the molecular mechanisms underlying implantation failure in PCOS subjects.

**Keywords:** CYP19, SOCS3, HOXA, Implantation, Polycystic ovary syndrome, Rat