Original Article

Effect of eicosapentaenoic acid on insulin resistance genes in granulosa cells of patients with polycystic ovarian syndrome

Heidari A[1], Nouri M [2], Sadaghiani M [2], Aghadavod E [3*]

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid-Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.
2- Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.
3- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received July 3, 2016; Accepted November 21, 2016

Abstract:

Background: Polycystic ovarian syndrome (PCOS) often induces reduced ovulation, infertility and insulin resistance. One of the most influential inducer factors in disease is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) a member of the nuclear receptor superfamily, which has a variety of physiological functions. PPARγ agonists are used for the treatment of insulin resistance, hyperandrogenism and ovarian dysfunction in PCOS patients. Fatty acids like eicosapentaenoic acid (EPA) and their metabolites are natural ligands for PPARγ and a good option for regulation of PPARγ gene expression.
Materials and Methods: This case-control study was carried out on 30 women with PCOS referred to the Tabriz-Alzahra fertility center for in vitro fertilization (IVF). Granulosa cells collected from follicular fluid of these individuals were cultured in vitro. Gene expression of PPARγ, insulin-like growth factor 1(IGF-1) and cyclooxygenase-2 were examined on cultured granulosa cells in culture medium and EPA–mediated culture media.
Results: The PPARγ gene expression was increased in EPA-treated medium with a maximum expression at a concentration of 100 mmol in 48 hours. On this basis, increment of PPARγ expression lead to the increased gene expression involved in the steroidogenesis, (i.e. IGF-1). However, the exptression of both genes were decreased in PCOS and the control medium.
Conclusion: In this study, we observed that different concentrations of EPA increased PPARγ gene expression.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, IGF-1, PPARγ, EPA

*** Corresponding Author.**
Email: Aghadavod@kaums.ac.ir
Tel: 0098 913 412 2334
Fax: 0098 315 554 1112

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2017; Vol. 20, No 6, Pages 501-508

Please cite this article as: Heidari A, Nouri M, Sadaghiani M, Aghadavod E. Effect of eicosapentaenoic acid on insulin resistance genes in granulosa cells of patients with polycystic ovarian syndrome. ***Feyz*** 2017; 20(6): 501-8.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

اثر اسید ایکوزاپنتاانوئیک بر بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به انسولین سلول‌های گرانولوزای بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک

اکبر حیدری [۱]، محمد نوری [۲]، مهزاد صدقیانی [۳]، عصمت آقاداود جلفائی [۴*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (Polycystic ovary syndrome; PCOS) اغلب باعث کاهش اوولاسیون، ناباروری و مقاوت به انسولین می‌گردد. یکی از عوامل موثر در بروز این بیماری گیرنده‌های Proxsisome proliferative–activated receptor gamma (PPARγ) می‌باشند که جزو گروهی از گیرنده‌های هسته‌ای هستند. آگونیست‌های PPARγ برای درمان مقاومت به انسولین، هیپرآندروژنیسم و اختلال عملکرد تخمدان در بیماران PCOS به‌کار می‌روند. اسیدهای چرب مثل EPA (Eicosapentaenoic acid) و متابولیت‌های آنها، لیگاندهای طبیعی برای PPARγ بوده و گزینه مناسبی برای تنظیم بیان این ژن محسوب می‌شوند.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی روی ۳۰ نفر از زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک مراجعه‌کننده به مرکز باروری الزهرا تبریز جهت درمان IVF (*in vitro* fertilization) مراجعه کرده بودند، انجام شد. ابتدا سلول‌های گرانولوزا از مایع فولیکولی این افراد جمع‌آوری گردید و سپس در محیط آزمایشگاهی کشت داده شد. میزان بیان ژن‌های PPARγ و (Insulin-like growth factor 1) IGF-1 در سلول‌های گرانولوزا در محیط کشت و در محیط کشت به‌همراه EPA بررسی گردید.

نتایج: بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزای کشت شده در محیط تیمار شده با EPA در مقایسه با محیط کشت کنترل افزایش یافت و این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکرومول و زمان ۴۸ ساعت بیشترین مقدار بود. هم‌چنین، افزایش بیان PPARγ منجر به افزایش ژن-های درگیر در استروئیدوژنز یعنی IGF-1 شد، درحالی‌که بیان هر دو ژن در بیماران PCOS و در محیط کشت کنترل کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که EPA باعث افزایش بیان ژن PPARγ و به‌دنبال آن IGF-1 در سلول‌های گرانولوزای بیماران مبتلا به PCOS می‌شود.

واژگان کلیدی: سندروم تخمدان پلی‌کیستیک، سلول‌های گرانولوزا، PPARγ، EPA

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۵، صفحات ۵۰۸-۵۰۱

مقدمه

ناباروری یکی از اختلالات شایع در بین افراد جامعه می-باشد و ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوج‌ها در سن باروری با این مشکل مواجه هستند، لذا، جهت درمان این بیماران نیاز به تکنیک‌های کمک باروری نظیر IVF می‌باشد که در آن امکان لقاح اسپرم و تخمک در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌گردد. بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک اغلب به‌علت اختلالات باروی برای کاندید IVF می‌شوند. بیماری PCOS یک سندروم متابولیسمی است که به‌علت عوامل ژنتیکی ناشناخته و اختلالات متابولیک، اغلب مبتلایان آن دچار مقاومت به انسولین وافزایش وزن می‌گردند و این عوامل خود می‌تواند روی مراحل تخمک گذاری، کیفیت اوولاسیون و تلقیح در طی مراحل IVF تاثیرگذار باشد [۱]. نشان داده شده است که یکی از عوامل مؤثر در بروز مقاومت به انسولین و سنتز هورمون‌های استروئیدی ژن PPARγ است. این خانواده ژنی جزو گروهی از گیرنده‌های داخل سلولی (هسته‌ای) به‌نام گیرنده‌های فعال کننده پراکسیزومی می‌باشد و شامل گیرنده‌های PPARα، PPARβ/δ وPPARγ می‌باشد که حاصل بیان سه ژن متفاوت می‌باشند و در تنظیم متابولیسم گلوکز و چربی‌ها و هم-چنین در تمایز سلولی نقش مهمی دارند. ژن PPARγ به‌طور عمده در بافت چربی بیان می‌شود و یک تنظیم کننده کلیدی تمایز چربی و ذخیره سازی تری‌گلیسرید است که میزان حساسیت انسولینی را افزایش داده و باعث کاهش میزان گلوکز خون در افراد دیابتی نوع دو می‌شود [۲]. مطالعات سلولی نشان می‌دهد که PPARγ در تنظیم تکامل فولیکول، تخمک گذاری، بلوغ اووسیت و حمایت از جسم زرد نیز دخالت داشته و این اعمال را از طریق تحریک یا مهار استروئیدوژنزیس، آنژیوژنزیس، ریمودلینگ بافتی، تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوزیس و متابولیسم لیپیدها انجام می‌دهد؛ این فرایندها برای عملکرد نرمال اووسیت حیاتی می‌باشند [۳]. از سوی

[۱] کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران ، ایران

[۲] استاد، مرکز تحقیقات سلامت و باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[۳] استادیار، مرکز تحقیقات سلامت و باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[۴] استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* **نشانی نویسنده مسئول:**
کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک

تلفن: ۰۹۱۳۴۱۲۲۳۳۴ **دورنویس:** ۰۳۱ ۵۵۵۴۱۱۱۲

پست الکترونیک: Aghadavod@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۹/۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

دیگر ژن PPARγ روی بیان ژن IGF-1 که در سلول‌های گرانو-لوزا بیان می‌شود نیز تاثیر می‌گذارد [۵،۴]. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که انتخاب فولیکول بالغ، رشد و بلوغ فولیکول، تخمک گذاری و کیفیت اووسیت و عملکرد متعاقب جسم زرد، بستگی به فعالیت‌های متوالی گنادوتروپین‌ها و تنظیم کننده‌های داخل تخمدانی از جمله IGF-1 دارد. بدین طریق تنظیم استروئیوژنزیس در سلول‌های گرانولوزا به‌واسطه آنزیم آروماتاز است که خود توسط ژن‌های IGF-1 و PPARγ کنترل می‌شود [۶]. بیان ژن PPARγ تحت تاثیر رژیم غذایی قرار می‌گیرد و اسیدهای چرب پلی‌انوئیک زنجیر بلند مثل EPA و متابولیت‌های آن‌ها لیگاندهای طبیعی برای بیان بیشتر اعضای خانواده PPAR هستند، لذا، گزینه مناسبی برای تنظیم بیان ژن PPARγ محسوب می‌شوند. هم‌چنین، برخی مطالعات نشان داده شده است که EPA باعث افزایش بیان ژن PPARγ در بافت چربی می‌شود [۶]. با توجه به اینکه سلول-های گرانولوزای انسانی نقش حیاتی در بلوغ و رشد اووسیت‌ها بر عهده دارند، به‌نظر می‌رسد فعالیت PPARγ در این سلول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پس از تخمک گذاری، بیان PPARγ در جسم زرد افزایش می‌یابد و در غیر این صورت رشد جسم زرد فروکش کرده و لقاح یا لانه گزینی جنین رخ نمی‌دهد [۷]. بنابراین، PPARγ ممکن است نقش مهمی در کنترل باروری داشته باشد. بیان PPARγ در جسم زرد ممکن است از طریق حفظ تولید پروژسترون برای حمایت از لانه گزینی و بارداری مهم باشد. مطالعات نشان داده است جنین‌هایی که PPARγ آنها حذف شده باشد، در ابتدای لانه گزینی می‌میرند [۸]. بااین‌حال، گزارشات اندکی در مورد تنظیم کننده‌های بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزای انسانی در دسترس است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر EPA روی بیان ژن PPARγ و IGF-1 روی مسیر استروئیدوژنز و تخمک گذاری در سلول‌های گرانولوزای انسانی می‌باشد که در صورت اثبات آن مصرف EPA به بیماران PCOS توصیه شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۹۰ روی ۳۰ بیمار مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک با میانگین سنی ۳۵-۲۰ سال و با شاخص ضریب توده بدنی نرمال که به‌علت مشکل ناباروری تحت درمان با IVF بودند و به مرکز باروری در بیمارستان الزهرا تبریز مراجعه کرده بودند، انجام شد. تشخیص بیماری PCOS توسط پزشک فوق تخصص نازایی و براساس معیارهای Rotterdam انجام شد. از ویژگی‌های بیماران مبتلا به سندروم پلی‌کیستیک تخمدان بر اساس معیارهای Rotterdam داشتن علائم اولیگومنوره و یا آمنوره، بروز هیپرآندروژنیسم، و مشاهده حداقل ۱۰ الی ۱۲ فولیکول با قطر ۶-۵ میلی‌متر در هر تخمدان توسط سونوگرافی می‌باشد. لازم به‌ذکر است بیماران انتخاب شده حداقل دو ویژگی از معیارهای Rotterdam را دارا بودند. در این مطالعه افرادی که داروهایی نظیر متفورمین و یا داروهای موثر بر هورمون‌ها و یا متابولیسم بدن مصرف کرده بودند، از مطالعه حذف شدند. هم‌چنین، وجود هرگونه اختلال رحمی، سابقه ابتلا به بیماری‌های غدد و التهابی از قبیل اختلال‌های تیروئیدی، آدرنال، اختلال در سیستم ایمنی و هورمون‌های جنسی جزو معیارهای خروج از مطالعه قرار گرفت. از مراجعین رضایت‌نامه کتبی برای شرکت در مطالعه گرفته شد و تمام نمونه‌ها در روز چهاردهم از سیکل قاعدگی بیماران اخذ شد. برای تحریک تخمدان در همه بیماران از روش Long protocol استفاده گردید؛ بدین طریق که کلیه بیماران از روز ۲۱ سیکل قبل از تحریک، تحت درمان با اگونیست گنادوتروپین (Aventis Pharma, Germany) قرار گرفتند و سپس از روز دوم تا سوم سیکل تحریک، تحت درمان با داروی گنادوتروپین یائسگی زنان یا (IBSA, HMG Switzer-land) به میزان ۳۰۰-۱۵۰ واحد در روز قرار گرفتند. کنترل روزانه بیمار از روز ششم به بعد به‌وسیله سونوگرافی و اندازه‌گیری سطح استرادیول تا روز ۱۴ تا ۱۶ سیکل انجام شد. در صورت رسیدن حداقل ۳ عدد از فولیکول‌های غالب به قطر بیش از ۱۸ میلی‌متر و افزایش کافی سطح ۱۷ بتا استرادیول سرم (کمتر از ۳۰۰۰ pg/ml) مقدار ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی hCG به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. فولیکول‌ها ۳۶ ساعت پس از تجویز آسپیره شده و پس از برداشت اووسیت برای انجام IVF، سلول‌های گرانولوزا از مایع فولیکولی در شرایط کاملا استریل جدا و جمع‌آوری شد. مایع فولیکولی به‌مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۵۰g سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب با ۱۰ میلی‌لیتر PBS شستشو داده شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۵۰g سانتریفیوژ گردید. پس از خارج کردن مایع رویی رسوب با حدود ۵ml محیط کشت DMEM کامل (حاوی ۵ درصد FBS، ۵ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین، ۲ درصد گلوتامین) حل شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه با هیالورونیداز ۰/۲ درصد (۸۰ IU-ml) انکوبه شد تا توده‌های سلولی باز شوند. بعد از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰g و مدت ۱۰ دقیقه، روی رسوب ۲ml محیط کشت ریخته شده و به آرامی روی ۴ml پرکول ۵۰ درصد اضافه کرده و ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰ سانتریفیوژ شد تا سلول‌های گرانولوزا از گلبول‌های قرمز خون جدا شوند [۹]. سلول‌ها به‌وسیله پیپت جدا شده و با ۶ ml

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

محیط کشت شستشو داده شده و ۵ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شدند [۹]. تعداد سلول‌های زنده با استفاده از هموسایتومتر و هم-چنین رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد و ۵۰۰۰۰۰ سلول در یک فلاسک مخصوص کشت ۲۵ml و با محیط DMEM (حاوی ۸ درصد FBS، پنی سیلین-استروپتومایسین ۵ درصد و گلوتامین ۲ درصد) کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت و چسبیدن به ته فلاسک، سلول‌ها با محیط DMEM کامل تغذیه شدند و این کار تا زمانی-که تراکم سلولی به ۷۰ درصد برسد، تکرار گردید. در این زمان سلول‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت و در محیط عاری از سرم با FSH تیمار شدند و ازآنجایی‌که سلول‌ها بعد از جمع‌آوری مجددا تحت تاثیر FSH قرار می‌گرفتند تا به مرحله تحریکی برسند، لذا نمونه-های سلول‌های گرانولوزا از افراد مختلف اختلاف نداشتند و به همین دلیل بررسی تک‌تک افراد ارزش نداشته و هدف بررسی عملکردی سلول‌های گرانولوزا بعد از تحریک با FSH بوده که در هر دو گروه سلولی کشت شده در محیط DMEM کامل و DMEM کامل به‌همراه دوزهای متفاوت EPA مقایسه شدند.

کونژوگاسیون اسیدایکوزا پنتاانوئیک (EPA):

ازآنجایی‌که اسیدهای چرب به‌تنهایی قادر به رسیدن به سطح سلول‌ها نیستند، برای دست‌یابی به این هدف، EPA با آلبومین سرم گاوی عاری از اسید چرب (BSA) کونژوگه گردید تا هم در محیط کشت رسوب نکند و هم قادر به عبور از غشاء سلول بوده و متعاقباً بتواند اثرات خود را اعمال کند. عمل کونژو-گاسیون مراحل تیمار اسید چرب روی سلول‌ها مرحله ضروری محسوب می‌گردد و کلیه مراحل بر اساس پروتکل AFO انجام شد [۱۰]. مراحل انجام کونژوگاسیون به‌قرار زیر صورت گرفت: ابتدا لازم بود آلبومین ۵ درصد تهیه گردد که برای انجام آن ۵cc آلبومین ۲۰ درصد در ۱۵cc محیط DMEM حل شد. سپس، ۱۰mg ایکوزاپنتاانوییک اسید در cc ۱۶/۶ آلبومین ۵ درصد حل شده و به‌منظور جلوگیری از اکسیداسیون ایکوزاپنتاانوییک اسید، گاز اکسیژن با استفاده از گاز نیتروژن خالی شده و به‌منظور کونژو-گاسیون ایکوزاپنتاانوییک اسید با آلبومین، نمونه به‌مدت ۴ ساعت در بن ماری ۳۷ قرار داده شد. جهت حذف آلودگی‌های احتمالی در زیر هود با فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون نمونه فیلتر گردید. سپس، غلظت‌های ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار EPA تهیه شد. بعد از ۴۸ ساعت تیمار با ۱۰۰ng FSH در محیط کشت عاری از سرم (به‌منظور دریافت هرچه بیشتر EPA توسط سلول‌های گرانولوزا کشت شده)، به محیط کشت سلولی DMEM کامل غلظت‌های مختلف EPA افزوده شد و نمونه‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. بعد از گذشت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک توسط محلول استخراج RNX-Plus شرکت سیناژن-ایران جدا شدند و براساس پروتکل کیت، نمونه‌های RNA سلول‌های گرانولوزا تخلیص شدند. نمونه‌های RNA بلافاصله توسط کیت سنتز cDNA از شرکت Bioneer مورد استفاده قرار گرفت. هریک از پرایمرها توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شده و سپس پرایمرها جهت سنتز به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد. از GAPDH به-عنوان ژن Housekeeping استفاده شد. برای ژن PPARγ پرایمرها با توالی Forward:5'ATGACAGACCTCAGA-CAGATTG3' و Reverse:5'AATGTTGGCAGTGGC-TCACGTG3' و برای ژن IGF-1 پرایمرها با توالی Forward: 5'GGTGGATGCTCTTCAGTTC3' و Reverse: 5TA-CATCTCCAGCCTCCTTAG3 انتخاب گردید و ژن GAPDH با توالی Forward: 5'AAGCTCATTTCCTG-GTATGACG3' Reverse: 5'TCTTCCTCTTGTGC-TCTTGCTGG3' انتخاب شید. با استفاده از کیت Syber green از شرکت Amplicon و با دستگاه Real- Time PCR از کمپانی BioRad iQ5 میزان بیان نسبی هریک از ژن‌ها بررسی گردید. آنالیز نتایج QRT-PCR با استفاده از روش Paffafi-qPCR انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۳ انجام شد. مقادیر میانگین±انحراف استاندارد (SD) بیان شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون t مستقل برای متغیرهای دارای توزیع نرمال و آزمون Mann-Whitney برای متغیرهای دارای توزیع غیرنرمال مورد بررسی قرار گرفت. در تمام موارد $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

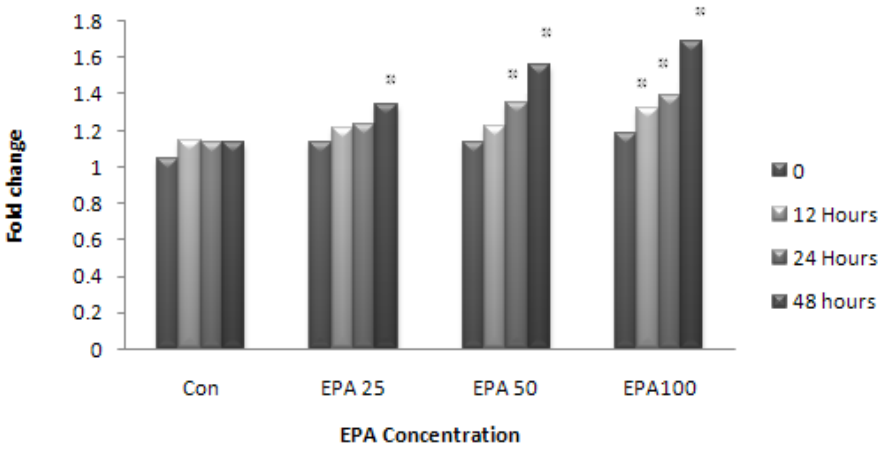
نتایج

نمودار شماره ۱ بیان‌گر میزان بیان نسبی ژن PPARγ است که به‌صورت fold change نمایش داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد در سلول‌های گرانولوزا که تحت تیمار با محیط کشت کامل (به‌عنوان گروه کنترل) و محیط کشت کامل به همراه دوزهای مختلف EPA بودند، در زمان صفر تفاوت معنی-داری در بیان ژن وجود ندارد ($P>۰/۰۵$). در زمان ۱۲ ساعت پس از کشت سلولی مشاهده شد که بیان ژن PPARγ در گروه کنترل و محیط کشت کامل به‌همراه دوز ۲۵ و ۵۰ میکرومول EPA، سطح بیان ژن افزایش جزئی می‌یابد؛ اگرچه این افزایش معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). می‌توان بیان نمود که ممکن است بخشی از این افزایش به‌علت FSH تراپی سلول‌های گرانولوزا است که قبل از

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

کشت سلولی انجام شده است، درحالی‌که در زمان ۱۲ ساعت با دوز ۱۰۰ میکرومول افزایش بیان ژن PPARγ در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$). در زمان ۲۴ ساعت پس از کشت سلولی افزایش معنی‌دار نسبی بیان ژن PPARγ تنها با دوزهای۵۰ و ۱۰۰ مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$).

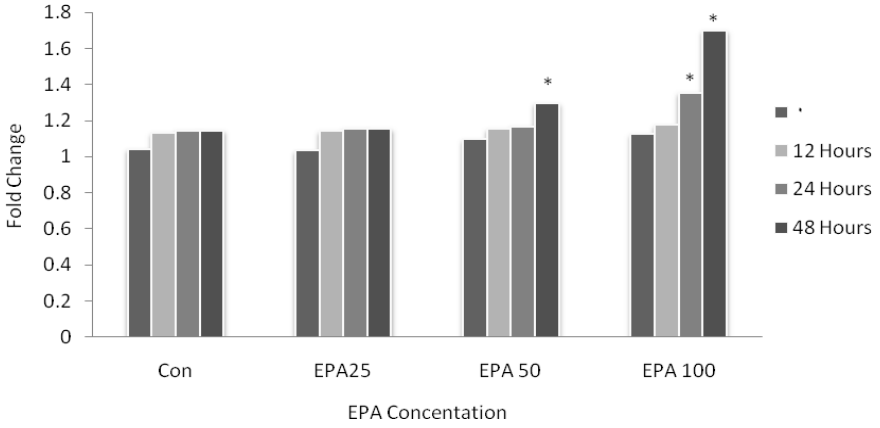
به‌علاوع، در زمان ۴۸ ساعت پس از کشت سلولی افزایش معنی‌دار بیان ژن با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ مشاهده گردید. لازم به‌ذکر است که این افزایش با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ کاملا مشهود می‌باشد ($P<۰/۰۵$).



نمودارشماره ۱- نمودار مقایسه بیان نسبی ژن PPARγ در زمان‌های مختلف بررسی

*: بیانگر تفاوت معنی‌دار گروه نسبت به گروه کنترل ($P<۰/۰۵$)

نمودار شماره ۲ بیانگر میزان بیان نسبی ژن IGF-1 است که به‌صورت fold change نمایش داده شده است. این نمودار نشان می‌دهد در سلول‌های گرانولوزا که تحت تیمار با محیط کشت کامل (به‌عنوان گروه کنترل) و محیط کشت کامل به همراه دوزهای مختلف EPA بودند، در زمان صفر تفاوت معنی‌داری در بیان ژن در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد ($P>۰/۰۵$). در زمان ۱۲ ساعت پس از کشت سلولی مشاهده شد که بیان ژن IGF-1 در گروه کنترل و محیط کشت کامل به همراه دوزهای مختلف ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰، سطح بیان ژن افزایش جزئی می‌یابد؛ اگرچه این افزایش در هیچ‌یک از گروه‌ها معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). می‌توان بیان نمود که این افزایش به‌علت FSH تراپی سلول‌های گرانولوزا است که قبل از کشت سلولی انجام شده است که افزایش جزئی بیان ژن PPARγ را نیز در پی داشته است. در زمان ۲۴ ساعت پس از کشت سلولی افزایش معنی‌دار نسبی بیان ژن IGF-1 تنها با دوز ۱۰۰ مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، در زمان ۴۸ ساعت پس از کشت سلولی، افزایش معنی‌دار بیان ژن تنها در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$).



نمودار شماره ۲- مقایسه بیان نسبی ژن IGF-1 در زمان‌های مختلف بررسی

*: بیانگر تفاوت معنی‌دار گروه نسبت به گروه کنترل ($P<۰/۰۵$)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

بحث

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک یکی از شایع‌ترین اختلالات غدد درون‌ریز در زنان و یکی از دلایل عمده ناباروری به‌شمار می‌رود که ابتلا به آن معمولا با اختلالات متابولیکی همراه است. این بیماران در مقایسه با زنان طبیعی، سطح متوسط LH بالاتر و FSH سرمی پایین‌تر از حد طبیعی دارند، هم‌چنین، مقدار آندروژن‌ها نیز افزایش می‌یابد که باعث بروز علائم هیپرآندروژنمیا در این بیماران می‌گردد. افزایش سطح آندروژن‌ها می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آروماتاز و اثر القایی SH برای ایجاد گیرنده‌های LH را در فولیکول‌ها مهار کند [۳]. به‌علاوه، برخی از مطالعات نشان می‌دهند که مصرف اسیدهای چرب غیراشباع به‌خصوص اسیدهای چرب امگا ۳ موجب بهبود شاخص‌های متابولیکی در زنان مبتلا به PCOS می‌شود [۴]. مشخص شده است که مصرف ایکوزاپنتانوئیک اسید به‌همراه دکوزاهگزانوئیک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به‌مدت ۲۴ ساعت در کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین موش باعث افزایش بیان ژن PPARγ و القای بیان ژن لپتین می‌گردد [۶]. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که مصرف روزانه ۳/۴ میلی‌گرم EPA به‌همراه دکوزاهگزانوئیک اسید به‌مدت ۲ تا ۳ ماه باعث تغییر پارامترهای میوکاردیوم در بیماران دارای ضعف عضله میوکاردیوم می‌گردد و بررسی‌های بیشتر این مطالعه نشان داده است که مصرف روزانه اسیدهای چرب غیر اشباع باعث افزایش بیان ژن PPARγ شده و در پی آن باعث افزایش بهتر اکسیداسیون میتوکندریایی می‌گردد [۱۱]. نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که EPA باعث افزایش بیان PPARγ در سلول‌های گرانولوزا بیماران مبتلا به PCOS می‌شود که در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۱۰۰ میکرومول بیشترین اثر را دارد. هم‌چنین، مطالعه حاضر نشان داد که EPA باعث افزایش بیان ژن IGF-1 در سلول‌های گرانولوزا می‌گردد که اگرچه این افزایش در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ مشاهده شد، اما در غلظت ۱۰۰ و به‌مدت ۴۸ ساعت کاملا چشم‌گیر بود. یکی از پیامدهای اثرات FSH در سلول‌های گرانولوزای انسان افزایش بیان ژن آروماتاز در این سلول‌ها و به‌دنبال آن افزایش تولید استروژن‌ها می‌باشد و یکی از ژن‌های دخیل در فعال شدن آنزیم آروماتاز، ژن IGF-1 است [۱]. هم‌چنین، فعال شدن ژن IGF-1 به‌طور مستقیم توسط فعال شدن ژن PPARγ صورت می‌گیرد و این تحریک از طریق فعال کردن PPARγ، عضو خانواده گیرنده هسته‌ای فاکتورهای رونویسی وابسته به لیگاند، رخ می‌دهد. به‌عبارت دیگر، می‌توان گفت در این بیماران به‌علت کاهش مقدار FSH و به‌دنبال آن کاهش بیان ژن آروماتاز، تولید استروژن‌ها کاهش می‌یابد که کاهش اوولاسیون را در پی دارد [۴]، درحالی‌که برخی از محققین به‌دنبال روشی هستند که بتوانند از طریق مکانیسم‌های دیگر بیان ژن آروماتاز را در این بیماران افزایش دهند و در مطالعات قبلی نشان داده شده است که ژن آروماتاز توسط فاکتور IGF-1 نیز می‌تواند فعال گردد [۱۲]. مشخص شده است که مصرف EPA به‌مدت ۲ ماه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم باعث افزایش برداشت اووسیت‌های بالغ از گاوهای نژاد Holstein می‌گردد، هم‌چنین، تعداد فولیکول‌های بزرگ آنها با قطر بیش از ۱۰ میلی‌متر افزایش معنی‌داری را نشان داده است [۱۳]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که مصرف EPA به‌مدت ۴۸ ساعت با دوز ۱۰۰ میکرو-مولار باعث افزایش چشم‌گیر در بیان ژن IGF-1 می‌گردد که خود به‌عنوان یک افکتور مثبت برای افزایش بیان ژن آروماتاز می‌باشد. طی رشد فولیکول اولیه تا مرحله انتخاب فولیکول بالغ، به‌تدریج بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزا افزایش می‌یابد که با افزایش بیان ژن آروماتاز، IGF-1 و تولید استروژن منجر به رشد و بلوغ اووست می‌شود. هم‌چنین، IGF-1 تکثیر سلول‌های گرانولوزا را تحریک می‌کند که با کمک FSH منجر به تولید استروژن در سلول‌های گرانولوزا شده و از طرف دیگر افزایش بیان PPARγ باعث مهار بیان ژن COX2 می‌گردد و بدین‌طریق از تخمک گذاری زودرس جلوگیری می‌کند [۱۴]. شواهد نشان می‌دهد که در حوالی روزهای ۱۳-۱۲ سیکل که فولیکول در مرحله بلوغ می‌باشد، بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزا به پیک خود می‌رسد که پس از طغیان LH بیان ژن PPARγ شدیدا کاهش یافته و در نتیجه اثر مهاری آن روی COX2 برداشته شده و فولیکول وارد فاز تخمک گذاری می‌شود [۱۵]، درحالی‌که در بیماران PCOS به‌علت کاهش FSH و کاهش بیان ژن‌های PPARγ و IGF-1 روند بلوغ فولیکول و به‌دنبال آن القا شدن اوولاسیون صورت نمی‌گیرد. لذا، افزایش تدریجی بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزا و در فاز فولیکولی در درمان زنانی که اختلال در بلوغ تخمک دارند و یا تخمک گذاری در آنها قبل از بلوغ تخمک و به‌صورت نارس رخ می‌دهد، می‌تواند مفید باشد [۲]. هم‌چنین، در برخی از مطالعات نشان داده شده است که PPARγ، نقش مهمی در تنظیم رشد فولیکول، بلوغ تخمک، اوولاسیون، حفظ جسم زرد، استروئیدوژنز، افزایش یا مهار آنژیوژنزیس در بافت اندومتر، بازسازی بافت، چرخه سلولی، آپوپتوز، و سوخت‌وساز چربی دارد که این مراحل برای عملکرد طبیعی تخمدان ضروری می‌باشند [۱۶،۱۱،۳]. در بیمارن مبتلا به PCOS یکی از علایم کاملا مشهود هیپرانسولینمیا و یا مقاومت به انسولین می‌باشد که البته نقش PPARγ و IGF-1 در کنترل هیپر-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

انسولینمیا مشخص شده است [۱۲] هم‌چنین، بیان شده است که در زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک مصرف ۶ هفته روغن سویا که حاوی اسیدهای چرب غیراشباع است باعث تغییر معنی‌دار در سطح تری‌گلیسرید و فاکتورهای التهابی می گردد [۱۷]. در مطالعه حاضر مشخص شده است که مصرف EPA با دوز ۱۰۰ میکرومول و به‌مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن PPARγ در سلول‌های گرانولوزا می‌گردد. در یک مطالعه مشخص گردید که مصرف EPA باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن PPARγ در سلول‌های بافت چربی می‌گردد [۸] که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد که مصرف EPA با دوز مناسب و در طی زمان خاص می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های PPARγ و IGF-1 گردد که هر دو این‌ها در مسیر استروئیدوژنز و مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به سندروم پلی‌کیستیک تخمدان دخیل می‌باشند. بنابراین، انتظار می‌رود با مصرف EPA و درنتیجه کنترل شدن مسیر استروئیدوژنز و مقاومت به انسولین روند فولیکوژنز در بیمارن مبتلا به سندروم پلی‌کیستیک تخمدان بهبود یابد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت و مساعدت‌های مرکز تحقیقات سلامتی و باروری زنان الزهرا تبریز و مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی تبریز انجام شده است که بدین‌وسیله از همکاری این مراکز تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی را داریم. لازم به ذکر است این مقاله از طرح تحقیقاتی به شماره ۲۰/۴-۸/۹ گرفته شده است.

References:

[1] Brazert M, Pawelczyk LA. Insulin-like growth factor-1 isoforms in human ovary. Preliminary report on the expression of the IGF-1 gene in PCOS patients and healthy controls. ***Ginekol Pol*** 2015; 86(12): 890-5.

[2] Rovito D, Giordano C, Plastina P, Barone I, De Amicis F, Mauro L, et al. Omega-3 DHA- and EPA-dopamine conjugates induce PPARgamma-dependent breast cancer cell death through autophagy and apoptosis. ***Biochim Biophys Acta*** 2015; 1850(11): 2185-95.

[3] Sharma S, Sharma PM, Mistry DS, Chang RJ, Olefsky JM, Mellon PL, et al. PPARG regulates gonadotropin-releasing hormone signaling in LbetaT2 cells in vitro and pituitary gonadotroph function in vivo in mice. ***Biol Reprod*** 2011; 84(3): 466-75.

[4] Nadjarzadeh A, Dehghani-Firouzabadi R, Daneshbodi H, Lotfi MH, Vaziri N, Mozaffari-Khosravi H. Effect of Omega-3 Supplementation on Visfatin, Adiponectin, and Anthropometric Indices in Women with Polycystic Ovarian Syndrome. ***J Reprod Infertil*** 2015; 16(4): 212-20.

[5] Lalia AZ, Lanza IR. Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids: Lost in Translation? ***Nutrients*** 2016; 8(6).

[6] Vargas ML, Almario RU, Buchan W, Kim K, Karakas SE. Metabolic and endocrine effects of long-chain versus essential omega-3 polyunsaturated fatty acids in polycystic ovary syndrome. ***Metabolism*** 2011; 60(12): 1711-8.

[7] Kokosar M, Benrick A, Perfilyev A, Fornes R, Nilsson E, Maliqueo M, et al. Epigenetic and Transcriptional Alterations in Human Adipose Tissue of Polycystic Ovary Syndrome. ***Sci Rep*** 2016; 6: 22883.

[8] Hasan AU, Ohmori K, Konishi K, Igarashi J, Hashimoto T, Kamitori K, et al. Eicosapentaenoic acid upregulates VEGF-A through both GPR120 and PPARgamma mediated pathways in 3T3-L1 adipocytes. ***Mol Cell Endocrinol*** 2015; 406: 10-8.

[9] Aghadavod E, Zarghami N, Farzadi L, Zare M, Barzegari A, Movassaghpour AA, et al. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. ***Adv Biomed Res*** 2015; 4: 250.

[10] Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladriere L, Ortis F ,Grieco FA, et al. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. ***Diabetologia*** 2010; 53(7): 1395-405.

[11] Anderson EJ, Thayne KA, Harris M, Shaikh SR, Darden TM, Lark DS, et al. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPARgamma activation? ***Antioxid Redox Signal*** 2014; 21(8): 1156-63.

[12] Rafraf M, Mohammadi E, Asghari-Jafarabadi M, Farzadi L. Omega-3 fatty acids improve glucose metabolism without effects on obesity values and serum visfatin levels in women with polycystic ovary syndrome. ***J Am Coll Nutr*** 2012; 31(5): 361-8.

[13] Elis S, Freret S, Desmarchais A, Maillard V, Cognie J, Briant E, et al. Effect of a long chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction variables in Holstein dairy cows. ***Anim Reprod Sci*** 2016; 164: 121-32.

[14] Gdula-Argasinska J, Czepiel J, Toton-Zuranska J, Wolkow P, Librowski T ,Czapkiewicz A, et al. n-3 Fatty acids regulate the inflammatory-state related genes in the lung epithelial cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. ***Pharmacol Rep*** 2016; 68(2): 319-28.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

[15] Bhaswant M, Poudyal H, Brown L. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. ***J Nutr Biochem*** 2015; 26(6): 571-84.
[16] Castillero E, Lopez-Menduina M, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Comparison of the effects of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic and fenofibrate on the inhibitory effect of arthritis on IGF1. ***J Endocrinol*** 2011; 210(3): 361-8.
[17] Damsgaard CT, Harslof LB, Andersen AD, Hellgren LI, Michaelsen KF, Lauritzen L. Fish oil supplementation from 9 to 18 months of age affects the insulin-like growth factor axis in a sex-specific manner in Danish infants. ***Br J Nutr*** 2016; 115(5): 782-90.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]