

مقاله اصلی

بررسی میزان بیان ژن *CYP19a1* و *17beta_HSD* در سندرم تخمدان پلی کیستیک در مدل موشی (*mus musculus*)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

خلاصه

مقدمه: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز در زنان سنین باروری است که با بی نظمی های هورمونی، اختلال در تخمک گذاری و تغییرات مورفولوژیک تخمدان همراه است. درک سازو کارهای مولکولی این بیماری، به ویژه مسیرهای مرتبط با استروئیدوژنز، برای بهبود تشخیص و توسعه درمان های هدفمند اهمیت بسزایی دارد. **روش کار:** این مطالعه با هدف بررسی الگوی بیان دو ژن کلیدی در استروئیدوژنز—*CYP19A1* (رمزکننده آنزیم آروماتاز) و $17\beta\text{-HSD}$ (۱۷-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز)—در مدل موشی PCOS طراحی شد. سی و پنج موش ماده NMRI به سه گروه تقسیم شدند: کنترل ($n=5$)، تیمار با تستوسترون انانتات ($n=15$) و تیمار با استرادیول والرات ($n=15$). پس از ۲۵ روز تیمار، نمونه گیری خون و تخمدان انجام شد و بیان ژن ها با Real-Time PCR ارزیابی گردید. تحلیل های هیستولوژیک و کمی سازی ساختار تخمدان نیز انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد بیان *CYP19A1* و $17\beta\text{-HSD}$ در گروه های تیمار شده به طور معنی داری افزایش یافته است. ($P < 0.0001$) هرچند این یافته ها نقش این ژن ها را در تظاهرات PCOS مدل موشی نشان می دهد، اما برای اعتبارسنجی به عنوان بیومارکر غیرتهاجمی در انسان، انجام مطالعات بالینی ضروری است.

کلمات کلیدی

سندرم تخمدان پلی کیستیک، ژن *CYP19A1*، ژن $17\beta\text{-HSD}$ ، استروئیدوژنز، مدل موشی، تستوسترون انانتات، بیومارکر، بیان ژن
پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

رکسانا رحمانی^۱

سهیلا طالش ساسانی^{۲*}

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی،

دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه گیلان، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

Email: sohilataleshasani@gmail.com

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در زنان سنین باروری است و حدود ۵ تا ۱۰ درصد این جمعیت را درگیر می‌کند (۱). این سندرم نه تنها عامل اصلی ناباروری آنولواتوار محسوب می‌شود، بلکه با طیف وسیعی از اختلالات متابولیک و قلبی-عروقی نظیر چاقی، دیس‌لیپیدمی، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و افزایش ریسک بیماری‌های قلبی-عروقی همراه است (۲). برآوردها نشان می‌دهد تا ۷۵٪ زنان مبتلا به PCOS دچار ناباروری و حدود ۴۰٪ آن‌ها با چاقی شدید دست‌وپنجه نرم می‌کنند. افزون بر این، وجود اختلال عملکرد اندوتلیال و التهاب مزمن با درجه پایین، احتمال بروز عوارض قلبی-عروقی و مرگ و میر را افزایش می‌دهد (۳).

از منظر ژنتیکی، شواهد متعددی از نقش عوامل وراثتی و چندعاملی در پاتوژنز PCOS حمایت می‌کند. مطالعات خانوادگی و دوقلوئی نشان داده‌اند که هیپرآندروژنیسم و ناهنجاری‌های متابولیک در بستگان درجه اول بیماران PCOS شایع‌تر است. اگرچه الگوی وراثت دقیق این بیماری هنوز به طور کامل شناخته نشده، اما PCOS به عنوان یک اختلال چندژنی و چندعاملی شناخته می‌شود که در آن تعامل پیچیده‌ای میان ژن‌های مرتبط با تولید و متابولیسم آندروژن‌ها، رشد فولیکولی و سیگنالینگ هورمونی وجود دارد (۴،۵).

در میان ژن‌های دخیل، *CYP19A1* که آنزیم آروماتاز را رمزگذاری می‌کند، نقش محوری در تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها ایفا می‌کند. این آنزیم عمدتاً در سلول‌های گرانولوزا، جسم زرد و فولیکول‌های تخمدان بیان می‌شود و تنظیم‌کننده اصلی سطح استروژن در تخمدان است. هرگونه اختلال در عملکرد یا بیان آروماتاز می‌تواند تعادل هورمونی را بر هم زند و منجر به اختلال در تخمک‌گذاری، بی‌تخمکی و تغییرات مورفولوژیک تخمدان شود (۶). مطالعات نشان داده‌اند که بیان یا فعالیت غیرطبیعی آروماتاز می‌تواند به هایپرآندروژنیسم و بروز فنوتیپ PCOS منجر گردد. علاوه بر این، تنظیم بیان *CYP19A1* ممکن است تحت تأثیر

فاکتورهای رونویسی مانند SF-1 و عوامل اپی‌ژنتیک قرار گیرد که خود می‌تواند زمینه‌ساز تفاوت‌های فردی در شدت بیماری باشد (۷).

دسته دیگری از آنزیم‌های کلیدی در مسیر استروئیدوژنز، خانواده ۱۷ β -HSD هستند که در تبدیل بین فرم‌های فعال و غیرفعال هورمون‌های جنسی نقش دارند. ایزوفورم‌های احیایی ۱۷ β -HSD تولید استروژن و آندروژن فعال را تسهیل می‌کنند، در حالی که ایزوفورم‌های اکسیداتیو موجب غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌شوند. این آنزیم‌ها در واکنش‌های متعدد بیوستتزی از جمله تبدیل DHEA به آندروستندیل‌ال، آندروستندیون به تستوسترون و استرون به استرادیول نقش دارند. بنابراین، تنظیم دقیق فعالیت این آنزیم‌ها برای رشد و عملکرد طبیعی بافت‌های تولیدمثلی و تعادل هورمونی حیاتی است (۸).

با توجه به ماهیت پیچیده و چندعاملی PCOS که ابعاد تولیدمثلی، متابولیک و حتی روانی را دربرمی‌گیرد—درک دقیق مسیرهای مولکولی زمینه‌ساز آن اهمیت ویژه دارد. ویژگی‌های تشخیصی اصلی PCOS شامل اختلال در تخمک‌گذاری، بی‌تخمکی و وجود مورفولوژی پلی‌کیستیک تخمدان است. باور بر این است که این فنوتیپ‌ها حاصل تعامل پیچیده‌ای میان بی‌نظمی‌های هورمونی، ژنتیکی و محیطی هستند. مطالعات اخیر به نقش تنظیمات اپی‌ژنتیک، میکروRNAها و فاکتورهای محیطی مانند تغذیه و استرس در بروز این سندرم اشاره دارند (۹،۱۰).

مدل‌های حیوانی، به ویژه مدل‌های موشی، ابزار ارزشمندی برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی و ژنتیکی PCOS فراهم می‌کنند. با این حال، باید توجه داشت که تفاوت‌های قابل توجهی در مسیرهای استروئیدوژنز و تنظیم هورمونی بین گونه‌های انسانی و موشی وجود دارد. به عنوان مثال، برخی ایزوفورم‌های ۱۷ β -HSD یا تنظیم‌کننده‌های رونویسی ممکن است در موش و انسان تفاوت عملکردی داشته باشند. بنابراین، یافته‌های حاصل از مدل‌های حیوانی باید با احتیاط به انسان تعمیم داده شوند و نیازمند اعتبارسنجی بالینی هستند (۱۱).

والرات برای شبیه‌سازی اختلالات محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان در غلبه استروژن. این رویکرد دوگانه، ارزش مدل حیوانی را برای بررسی تطبیقی مسیرهای هورمونی و مولکولی افزایش می‌دهد.

جمع‌آوری نمونه‌ها و تحلیل‌های بافت‌شناسی

در پایان دوره تیمار، حیوانات با روش جابه‌جایی گردنی قربانی شدند. نمونه خون از چهار موش در هر گروه به صورت تصادفی برای تحلیل‌های مولکولی جمع‌آوری شد (انتخاب این تعداد به دلیل محدودیت‌های عملیاتی و رعایت اصول رفاه حیوانات بوده است؛ با این حال، افزایش تعداد نمونه برای افزایش توان آماری توصیه می‌شود). تخمدان‌ها به روش جراحی برداشت و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. آماده‌سازی بافت شامل آب‌گیری، قالب‌گیری پارافینی، برش‌گیری (۵ میکرومتر) و رنگ‌آمیزی H&E بود. علاوه بر ارزیابی کیفی، شمارش تعداد کیست‌ها، ضخامت استروما و مرحله‌بندی فولیکول‌ها به صورت کمی انجام شد تا داده‌های عینی‌تری از تغییرات مورفولوژیک به دست آید.

استخراج RNA و تحلیل بیان ژن

استخراج RNA از بافت تخمدان و خون محیطی با استفاده از کیت‌های استاندارد انجام شد و سنتز cDNA صورت گرفت. بیان ژن‌های CYP19A1 و β -HSD با Real-Time PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ارزیابی شد. لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد استفاده عمدتاً ایزوفورم β -HSD نوع ۱ را هدف قرار دادند (در صورت هدف قرار دادن همه ایزوفورم‌ها، دلیل علمی آن باید ذکر شود). توالی پرایمرها در جدول ۱ با فرمت استاندارد (۵'→۳') ارائه شده است.

اعتبارسنجی مدل و تحلیل هورمونی

القای فنوتیپ PCOS علاوه بر ارزیابی هیستولوژیک، با اندازه‌گیری سطوح تستوسترون و استرادیول سرم به روش الیزا تأیید شد تا وجود هاپرآندروژنیسم یا غلبه استروژن در مدل‌ها به طور بیوشیمیایی اثبات گردد.

در این مطالعه، با هدف روشن‌سازی نقش ژن‌های CYP19A1 و β -HSD در تظاهرات PCOS، الگوی بیان این ژن‌ها در مدل موشی PCOS القا شده با تستوسترون انانتات و استرادیول والرات بررسی شد. همچنین تلاش شد تا با تحلیل کمی و کیفی ساختار تخمدان و ارزیابی سطوح هورمونی، ارتباط میان تغییرات بیان ژنی و فنوتیپ‌های کلینیکی مدل PCOS شفاف‌سازی شود. نتایج این پژوهش می‌تواند به شناسایی نشانگرهای مولکولی جدید برای تشخیص زودهنگام یا توسعه درمان‌های هدفمند در PCOS کمک کند، هرچند اعتبارسنجی این یافته‌ها در جمعیت انسانی ضروری است.

مواد و روش‌ها

مدل حیوانی و طراحی آزمایش

این مطالعه تجربی بر روی ۳۵ موش ماده NMRI (Musculus) با سن ۳۰ تا ۳۵ روز و وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم انجام شد. حیوانات از مرکز حیوانات آزمایشگاهی تهیه و در شرایط محیطی کنترل‌شده (دمای ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به غذای استاندارد و آب آشامیدنی) نگهداری شدند. پس از یک هفته سازگاری، موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: کنترل (n=5)، تیمار با استرادیول والرات (n=15) و تیمار با تستوسترون انانتات (n=15). کلیه مراحل مطالعه با رعایت اصول اخلاقی و براساس مجوز کمیته اخلاق پژوهش حیوانی (شماره مجوز: درج شود) انجام شد.

القای مدل PCOS و توجیه انتخاب هورمون‌ها

برای القای فنوتیپ‌های مشابه PCOS، موش‌های گروه‌های آزمایشی به مدت ۲۵ روز متوالی، روزانه ۱/۰ میلی‌لیتر از استرادیول والرات یا تستوسترون انانتات (شرکت داروسازی ابوریحان، ایران) را به صورت عضلانی دریافت کردند. استفاده از این دو هورمون، امکان بازآفرینی دو الگوی غالب هورمونی در بیماران انسانی مبتلا به PCOS را فراهم می‌کند: تستوسترون انانتات برای القای هاپرآندروژنیسم و استرادیول

جدول ۱. آغازگرهای این مطالعه

Name	sequence (5' → 3')	Tm (°C)	length (bp)
CYP19A1-F	TCATTATCAGCAAGTCCTCAAG	55.89	۱۳۴
CYP19A1-R	GCTCGGGTTGTTGTAAATATG	56.04	
17β-HSD-F	GCTTCAAAGTTTATGCCACA	54.77	۱۱۲
17β-HSD-R	ACATCCAATTCCAGTATCTCC	54.77	
GAPDH-F	TCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTC	61.3	۲۵۰
GAPDH-R	ACTGTGGTCATGAGCCCTTC	59.67	

آنالیز بیان ژن

به منظور ارزیابی دقیق تغییرات بیان ژنی، استخراج RNA کل از بافت تخمدان و خون محیطی با استفاده از کیت استخراج RNA تجاری (Invitrogen, USA) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. کیفیت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop USA) سنجیده شد؛ نمونه‌هایی با نسبت جذب A260/A280 بین ۱٫۸ تا ۲٫۰ برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل (cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) و طبق پروتکل استاندارد شرکت سازنده انجام شد. جهت سنجش بیان نسبی ژن‌های هدف، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR) با استفاده از شیمی SYBR Green (Applied Biosystems, USA) بر روی دستگاه Real-Time PCR (ABI StepOnePlus) اجرا گردید. برای هر ژن، آغازگرهای اختصاصی (Primer) طراحی و صحت آن‌ها با BLAST تأیید شد؛ توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش‌های PCR برای هر نمونه در سه تکرار (triplicate) انجام شد تا از تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل گردد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع (Housekeeping gene) جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان ژنی مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد که

امکان مقایسه دقیق سطح بیان ژن‌های هدف در گروه‌های مختلف را فراهم می‌سازد. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات PCR و عدم وجود دایمر پرایمر یا محصولات غیراختصاصی، آنالیز منحنی ذوب (melting curve analysis) پس از اتمام واکنش انجام شد. در مجموع، این رویکرد مولکولی با دقت بالا، امکان ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های CYP19A1 و 17β-HSD را در مدل‌های مختلف حیوانی فراهم ساخت و داده‌های حاصل، مبنای تحلیل‌های آماری و تفسیرهای بیولوژیک پژوهش قرار گرفت.

تحلیل آماری

کلیه تحلیل‌های آماری این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸٫۰ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) انجام شد. در گام نخست، برای اطمینان از انتخاب صحیح آزمون‌های آماری، توزیع داده‌ها از نظر نرمال بودن با آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) و همچنین آزمون لگ نرمالیتی مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی‌ها به منظور تعیین امکان استفاده از آزمون‌های پارامتریک یا نیاز به آزمون‌های ناپارامتریک صورت پذیرفت.

برای مقایسه سطوح بیان ژن‌های CYP19A1 و 17β-HSD در میان سه گروه مطالعه (کنترل، تیمار با تستوسترون انانتات و تیمار با استرادیول والرات)، ابتدا آمار توصیفی شامل

میانگین و انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) برای هر گروه محاسبه شد. سپس، جهت بررسی وجود تفاوت معنادار کلی بین گروه‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده گردید. در صورت مشاهده اختلاف معنادار، جهت تعیین دقیق زوج‌گروه‌های دارای تفاوت، آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post hoc test) به کار گرفته شد.

تمامی آزمون‌ها به صورت دوطرفه انجام شد و سطح معنی‌داری آماری در مقدار p کمتر از ۰,۰۵ در نظر گرفته شد. جهت نمایش بصری داده‌ها، از نمودارهای ستونی (bar graphs) و نمودارهای پراکندگی (scatter plots) استفاده شد که با همان نرم‌افزار ترسیم گردیدند. میله‌های خطا (error bars) بیانگر انحراف معیار بودند. این روش آماری، امکان تحلیل دقیق روندهای بیانی و تفسیر شفاف داده‌ها را فراهم نمود. همچنین، برای اطمینان از صحت نتایج و کاهش خطاهای نوع اول و دوم، کلیه تحلیل‌ها با دقت و بازبینی دو مرحله‌ای انجام شد.

نتایج

تأیید بافت‌شناسی القای PCOS در مدل‌های موشی
در مجموع، ۶۰ موش ماده نژاد NMRI با وزن بدن بین ۲۵ تا ۳۰ گرم در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. پس از دوره تطبیق، حیوانات به صورت تصادفی در یکی از سه گروه قرار گرفتند: گروه کنترل بدون تیمار، گروه تیمار شده با تستوسترون انانتات و گروه تیمار شده با استرادیول والرات. هر گروه تیمار شده به مدت ۳۰ روز، به صورت داخل عضلانی، هورمون دریافت کرد. در پایان دوره تیمار، کلیه موش‌ها قربانی شده و نمونه‌گیری زیستی و بررسی‌های بافت‌شناسی انجام شد.

پس از کالبدگشایی، تخمدان‌های دو طرف به دقت جدا شده و به صورت میکروسکوپی از نظر وجود ویژگی‌های کیستی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۱، نمونه‌ای از روند جدا کردن تخمدان‌ها در یک موش تیمار شده را نشان می‌دهد که

حذف آناتومیک تخمدان‌ها را به تصویر می‌کشد. معاینه مورفولوژیکی کلی نشان داد که تخمدان‌های هر دو گروه تیمار شده دارای ساختارهای متعددی شبیه کیست هستند که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن القای PCOS است. در مقابل، تخمدان‌های گروه کنترل مورفولوژی طبیعی داشتند و فولیکول‌های سالم و جسم زرد قابل مشاهده بودند.

ارزیابی‌های بافت‌شناسی بعدی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) این مشاهدات را تأیید کرد. بافت تخمدان موش‌های تیمار شده، دارای فولیکول‌های کیستی متعدد زیرکپسولی با لایه‌های نازک شده سلول‌های گرانولوزا و فقدان جسم زرد بود که از ویژگی‌های کلاسیک مورفولوژی پلی‌کیستیک تخمدان محسوب می‌شود. در مقابل، تخمدان‌های گروه کنترل، فولیکول‌ها و سازمان‌بندی استرومال سالم و دست‌نخورده را نشان دادند. این نتایج صحت ایجاد موفقیت آمیز ویژگی‌های مشابه PCOS در مدل حیوانی را با استفاده از پروتکل‌های القای هورمونی تأیید می‌کند.



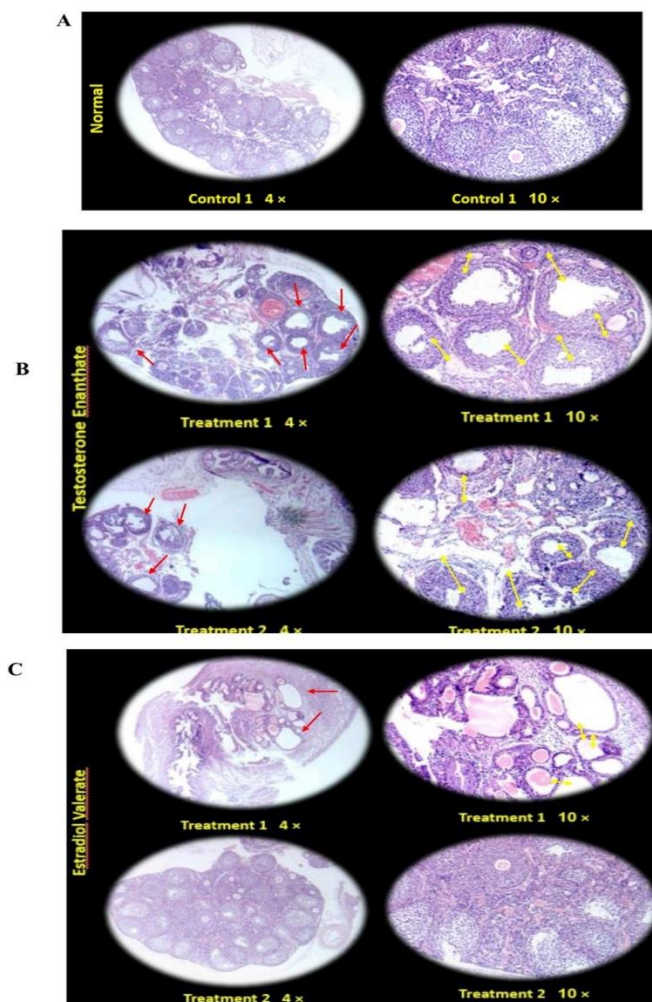
شکل ۱. روند حذف آناتومیک تخمدان‌ها در یک موش تیمار شده

نتایج آسیب‌شناسی بافت تخمدان

نمونه‌های بافت تخمدان که در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شده بودند، برش‌گیری شده و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) برای ارزیابی شدت التهاب، تغییرات اپیتلیال و دگرگونی‌های ساختار مخاطی مورد بررسی قرار گرفتند.

مقاطع بافت تخمدان موش‌های بیمار تحت تیمارهای مختلف را نشان می‌دهند. با مقایسه این تصاویر، می‌توان تغییرات بافتی تخمدان‌ها که ناشی از القای بیماری است را مشاهده نمود.

بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی تخمدان در موش‌های تیمار شده، فرسایش اپیتلیال و التهاب سطحی را نشان داد. شکل ۲ A تصاویر مقاطع عرضی بافت تخمدان موش‌های سالم را نمایش می‌دهد، در حالی که شکل‌های ۲ B و C۲،



(الف) تحلیل میکروسکوپی مقاطع تخمدان از گروه کنترل موش‌های NMRI، ساختار طبیعی تخمدان شامل فولیکول‌های واضح، اجسام زرد سالم و سازمان‌بندی دست‌نخورده استروما را نشان داد.

(ب) بافت تخمدان موش‌های تیمار شده با تستوسترون انانتات تغییرات پاتولوژیک قابل توجهی را به‌نمایش گذاشت، از جمله افزایش محسوس ضخامت استروما که نمایانگر هیپرپلازی استرومال است و ضخیم‌شدن تونیکا آلبوژینا (با فلش‌های زرد رنگ مشخص شده). علاوه بر این، چندین کیست کوچک زیرکپسولی با قطر بین ۲ تا ۹ میلی‌متر (با فلش‌های قرمز مشخص شده) مشاهده شد که از ویژگی‌های مورفولوژی پلی‌کیستیک تخمدان است.

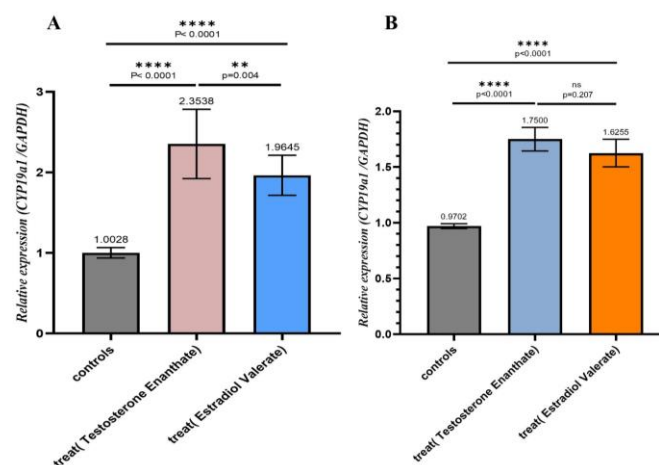
(ج) در مقابل، درمان با استرادیول والرات منجر به شکل‌گیری فولیکول‌های کیستی بزرگ منفرد با قطر حداقل حدود ۱۰ میلی‌متر (فلش‌های قرمز) شد، در حالی که ضخامت تونیکا آلبوژینا و استروما در محدوده نرمال بافت‌شناسی باقی ماند (فلش‌های زرد). این الگوهای متفاوت تشکیل کیست و تغییرات استرومال بین دو گروه تیمار، مکانیسم‌های هورمونی متمایز در پاتوفیزیولوژی PCOS را منعکس می‌کند و استفاده از این مدل دوگانه را برای تحلیل‌های مقایسه‌ای توجیه می‌نماید.

شکل ۲. ارزیابی آسیب‌شناسی بافت تخمدان

تحلیل بیان ژن CYP19A1

تحلیل کمی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (qRT-PCR) نشان داد که بیان ژن CYP19A1 به طور معناداری در هر دو گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. ($p < 0.0001$) در بافت تخمدان، گروه تیمار شده با تستوسترون انانتات بیشترین افزایش سطح بیان ژن را نشان داد (2.35 ± 0.08)، پس از آن گروه تیمار شده با استرادیول والرات (1.96 ± 0.06) قرار داشت، در حالی که گروه کنترل مقدار پایه (1.00 ± 0.02) را داشت. الگوهای مشابهی در نمونه‌های خون محیطی مشاهده شد؛ سطوح بیان ژن به ترتیب در گروه تستوسترون به 1.75 ± 0.05 و در گروه استرادیول به 1.62 ± 0.06 افزایش یافت، که در مقایسه با گروه کنترل (0.97 ± 0.01) افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن

CYP19A1 هم در سطح سیستمیک و هم در بافت تخمدان تحت تأثیر تیمار هورمونی قرار گرفته است. آزمون مقایسه چندگانه توکی نشان داد که تفاوت‌های هر گروه تیمار با گروه کنترل بسیار معنادار ($p < 0.0001$) هستند. همچنین، اختلاف معنی‌داری در بیان ژن CYP19A1 بین دو گروه تیمار در بافت تخمدان نیز مشاهده شد ($p = 0.0044$)، که نشان‌دهنده اثر محرک قوی‌تر تستوسترون انانتات بر بیان ژن آروماتاز در سطح تخمدان است. با این حال، این تفاوت در نمونه‌های خون معنی‌دار نبود ($p > 0.05$)، که ممکن است ناشی از مکانیسم‌های تنظیمی خاص بافتی باشد (شکل ۳). این یافته‌ها نقش مرکزی آروماتاز در ناهنجاری هورمونی مرتبط با PCOS را تقویت کرده و CYP19A1 را به عنوان نشانگر مولکولی بالقوه‌ای برای شناسایی بیماری در فنوتیپ‌های دارای هاپیرآندروژنیسم و غالب استروژنی برجسته می‌سازد.



شکل ۳. بیان نسبی ژن CYP19A1 در بافت تخمدان و خون محیطی. (A) بیان نسبی ژن CYP19A1 در سه گروه مورد مطالعه (نمونه‌های بافت تخمدان)، (B) بیان نسبی ژن CYP19A1 در سه گروه مورد مطالعه (نمونه‌های خون محیطی)

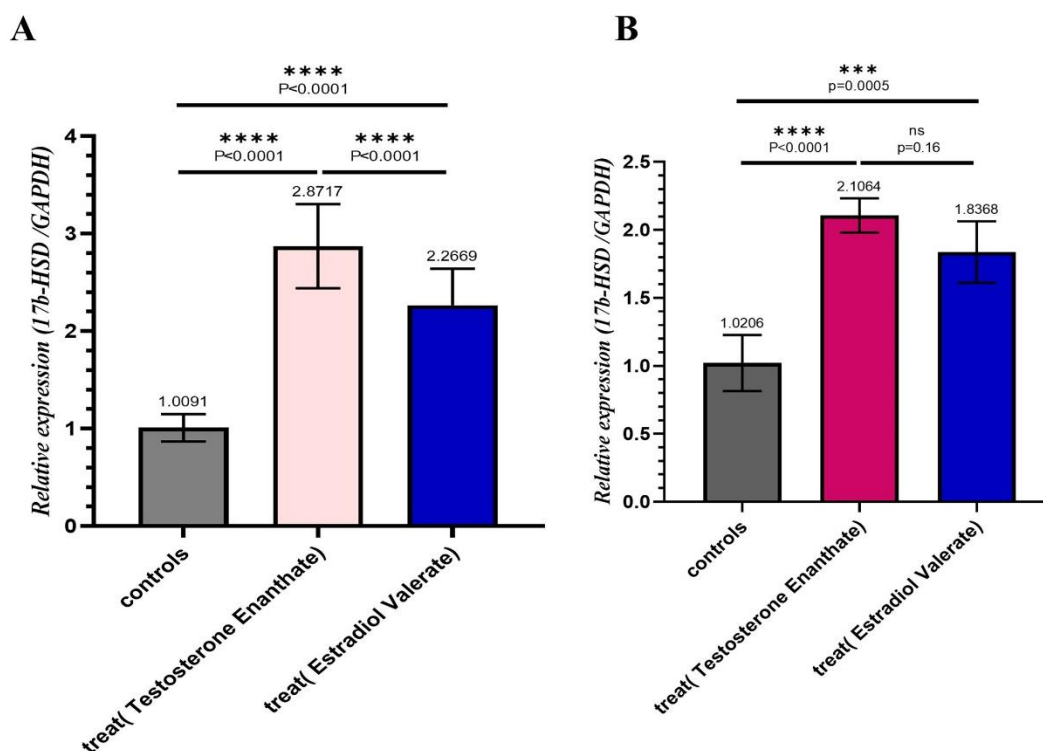
تحلیل بیان ژن β -HSD17

هم‌راستا با نتایج به‌دست‌آمده برای ژن CYP19A1، تحلیل کمی بیان ژن β -HSD17 نیز نشان داد که سطح mRNA این ژن در هر دو گروه تیمار شده با هورمون در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافته است. در بافت تخمدان، موش‌های تیمار شده با تستوسترون انانتات بالاترین سطح بیان

ژن β -HSD17 را نشان دادند (2.87 ± 0.08)، و پس از آن گروه استرادیول والرات قرار داشت (2.26 ± 0.09). این مقادیر به‌طور چشمگیری بالاتر از گروه کنترل (1.00 ± 0.01) بودند و تحلیل آماری نیز نشان داد که این تفاوت‌ها بسیار معنادار هستند. در نمونه‌های خون محیطی نیز الگوهای مشابهی مشاهده شد؛ سطح بیان ژن β -HSD17 در گروه

محیطی از نظر آماری معنادار نبود ($p > 0.05$)، که حاکی از وجود اثر موضعی تستوسترون بر استروئیدوژنز تخمدانی است که لزوماً به الگوی بیان سیستمیک منتقل نمی‌شود (شکل ۴) این داده‌ها بر نقش مهم ژن $17\beta\text{-HSD}$ در متابولیسم هورمون‌های استروئیدی مرتبط با PCOS تأکید دارند و از آن به‌عنوان یک نشانگر مولکولی اختصاصی بافتی در چشم‌انداز پاتوفیزیولوژیک این اختلال حمایت می‌کنند

تستوسترون $2/01 \pm 0/06$ و در گروه استرادیول $1/83 \pm 0/11$ بود، که در مقایسه با گروه کنترل ($1/02 \pm 0/01$) تفاوت معناداری ($p < 0.0001$) نشان داد. آزمون مقایسه چندگانه توکی (Tukey) معناداری آماری تفاوت بین هر گروه بیمار شده و گروه کنترل را تأیید کرد. همچنین، مقایسه بین دو گروه بیمار شده با هورمون نیز تفاوت معناداری در بافت تخمدان نشان داد ($p < 0.0001$) که بیانگر اثر قوی‌تر تستوسترون انانتات در افزایش بیان $17\beta\text{-HSD}$ در محل تخمدان است. با این حال، این تفاوت در نمونه‌های خون



شکل ۴. بیان نسبی ژن $17\beta\text{-HSD}$ در بافت تخمدان و خون محیطی (A). بیان نسبی ژن $17\beta\text{-HSD}$ در سه گروه مورد مطالعه (نمونه‌های بافت تخمدان) (B) بیان نسبی ژن $17\beta\text{-HSD}$ در سه گروه مورد مطالعه (نمونه‌های خون محیطی)

اختلال در مسیر استروئیدوژنز به‌عنوان ویژگی مرکزی پاتوفیزیولوژیک آن شناخته می‌شود.

در این مطالعه، بیان دو ژن کلیدی استروئیدوژنیک— $CYP19A1$ (آروماتاز) و $17\beta\text{-HSD}$ (۱۷-بتا-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز)—در مدل موشی PCOS القا شده با تستوسترون انانتات (TE) و استرادیول والرات (E2V) بررسی شد. یافته‌های ما نشان‌دهنده افزایش معنادار

بحث

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یک اختلال پیچیده و چندعاملی غدد درون‌ریز-متابولیک است که ۵ تا ۱۵ درصد زنان در سنین باروری را درگیر می‌کند و با هایپرآندروژنیسم، اختلال عملکرد تخمک‌گذاری و اختلالات متابولیک مانند مقاومت به انسولین و دیس‌لیپیدمی مشخص می‌شود. اگرچه اتیولوژی مولکولی PCOS به‌طور کامل شناخته نشده است،

بیان هر دو ژن در بافت تخمدان و خون محیطی موش‌های تیمار شده نسبت به کنترل‌ها بود که گروه TE بیشترین تغییرات را نشان داد.

افزایش بیان مشاهده شده CYP19A1 و β -HSD ۱۷ احتمالاً بازتاب مکانیسم‌های جبرانی در پاسخ به اختلالات هورمونی است. (۱۰). افزایش بیان CYP19A1 که آنزیم آروماتاز را رمزگذاری می‌کند، ممکن است پاسخ بازخوردی به افزایش سطح آندروژن‌ها باشد که هدف آن بازگرداندن تعادل استروژن-آندروژن است. پانگیانگانی و همکاران (۲۰۲۰) نیز افزایش بیان CYP19A1 را در سلول‌های گرانولوزای بیماران PCOS گزارش کردند که نشان‌دهنده مکانیسم جبرانی محافظت‌شده در گونه‌های مختلف است. این افزایش ممکن است از طریق فعال‌سازی وابسته به گیرنده آندروژن (AR) عوامل رونویسی مانند SF-1 و LRH-1 یا تغییرات اپی‌ژنتیکی شامل هیپومتیلایسون مناطق پروموتور CYP19A1 واسطه شود (۱۲). با این حال، مطالعات دیگر مانند Kong et al., 2021 نشان داده‌اند که بیان آروماتاز ممکن است در مرحله توقف فولیکولی اولیه در PCOS سرکوب شود که بیانگر وابستگی تنظیم CYP19A1 به مرحله و زمینه است (۱۴).

در مورد β -HSD ۱۷، این خانواده آنزیمی مسئول تبدیل متقابل استروئیدهای جنسی فعال و غیرفعال است (۱۵، ۱۶). قابل توجه است که مطالعه ما تفکیکی بین ایزوفورم‌ها انجام نداد، که محدودیتی است زیرا بیش از ۱۵ ایزوفورم با توزیع بافتی و عملکردهای متفاوت وجود دارد. در زمینه PCOS، ایزوفورم‌هایی مانند HSD17B1 (سنتز استرادیول) و HSD17B5 (سنتز تستوسترون) اهمیت ویژه‌ای دارند. افزایش بیان مشاهده شده ممکن است بازتاب فعالیت آندروژنی افزایش‌یافته از طریق HSD17B5 یا تغییر متابولیسم استروژن از طریق HSD17B1 باشد، اما برای تفسیر مکانیکی دقیق نیاز به تحلیل‌های ایزوفورم-محور وجود دارد. یافته کلیدی دیگر، افزایش قوی‌تر بیان هر دو ژن در گروه تستوسترون انانتات نسبت به استرادیول والرات بود. این امر حمایت می‌کند از این فرض که افزایش آندروژن تأثیر

قوی‌تری بر محور استروئیدوژن دارد، احتمالاً از طریق فعال‌سازی رونویسی وابسته به AR و مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دستی مانند PI3K/Akt و mTOR این مسیرها می‌توانند بیان ژن و مورفولوژی تخمدان را بیشتر تنظیم کنند و به فنوتیپ شدیدتر PCOS در مدل‌های مبتنی بر آندروژن کمک نمایند. اگرچه مدل‌های موشی دیدگاه‌های مکانیکی ارزشمندی فراهم می‌کنند (۱۷)، محدودیت‌های متعددی در تعمیم این یافته‌ها به انسان وجود دارد. تفاوت‌های گونه‌ای قابل توجهی در تنظیم ژن‌های استروئیدوژنیک، استفاده از پروموتورها و بیان ایزوفورم‌ها وجود دارد (۱۸). برای مثال، تنظیم CYP19A1 در موش‌ها شامل مناطق پروموتور متفاوتی نسبت به انسان است که می‌تواند پاسخ‌های متفاوتی به محرک‌های هورمونی ایجاد کند (۱۹). به همین ترتیب، بیان و عملکرد ایزوفورم‌های خاص β -HSD ۱۷ بین گونه‌ها متفاوت است که ممکن است بر ارتباط انتقالی یافته‌ها به انسان تأثیر بگذارد. افزایش مداوم بیان CYP19A1 و β -HSD ۱۷ در هر دو بافت تخمدان و خون محیطی، امکان استفاده از این ژن‌ها به عنوان بیومارکرهای کم‌تهاجمی برای تشخیص یا پایش PCOS را مطرح می‌کند (۲۰). با این حال، شواهد کنونی از مطالعات انسانی برای حمایت از کاربرد بالینی آن‌ها ناکافی است. به عنوان مثال، Emami و همکاران (۲۰۲۱) کاهش بیان CYP19A1 را در بافت چربی زنان مبتلا به PCOS گزارش کردند که نشان‌دهنده تغییرات وابسته به نوع بافت و زمینه است (۲۱). بنابراین، اعتبارسنجی بیشتر در کوهورت‌های انسانی بزرگ و دقیق ضروری است تا بتوان این نشانگرها را برای کاربرد بالینی توصیه کرد.

نتیجه‌گیری

مطالعه ما افزایش معنادار بیان ژن‌های CYP19A1 و β -HSD ۱۷ را در مدل موشی PCOS القاشده با تستوسترون انانتات و استرادیول والرات نشان داد. این یافته‌ها نقش مرکزی اختلال استروئیدوژن در پاتوژن PCOS را تقویت کرده و پیشنهاد می‌کنند که تغییر بیان این ژن‌ها ممکن است به

بی‌تعادلی هورمونی و اختلال عملکرد فولیکولی کمک کند. با این حال، فقدان تحلیل ایزوفورم-محور، تفاوت‌های گونه‌ای و نبود اعتبارسنجی مستقیم انسانی، نیازمند احتیاط در تفسیر نتایج به‌عنوان شواهد کاربرد بالینی بیومارکرها است. تحقیقات بیشتر که داده‌های ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و محیطی را با هم ادغام کند، همراه با اعتبارسنجی دقیق در جمعیت‌های انسانی، برای روشن‌سازی نقش مکانیکی این ژن‌ها و ارزیابی پتانسیل آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی یا پیش‌آگهی ضروری است. در نهایت، چنین مطالعاتی می‌تواند راه را برای مدیریت بهبود یافته و فردی‌سازی شده زنان مبتلا به PCOS هموار سازد.

تحقیقات آینده باید با انجام تحلیل‌های ایزوفورم‌محور، مانند استفاده از qPCR اختصاصی یا RNA-seq، به تفکیک

دقیق‌تر نقش ایزوفورم‌های مختلف بپردازند. همچنین، کمی‌سازی دقیق پارامترهای هیستولوژیک و هورمونی ضروری است تا ارتباط بین تغییرات مولکولی و شدت فنوتیپی بهتر مشخص شود. انجام مطالعات طولی نیز اهمیت دارد تا بتوان تغییرات دینامیک بیان ژن‌ها را در طول زمان رصد کرد و روند پیشرفت بیماری را به‌دقت بررسی نمود. علاوه بر این، اعتبارسنجی یافته‌ها در کوهورت‌های انسانی مبتلا به PCOS برای تضمین قابلیت تعمیم نتایج حیاتی است. در نهایت، بررسی مکانیسم‌های تنظیمی بالادستی، شامل عوامل رونویسی، میکروRNAها و تغییرات اپی‌ژنتیکی، می‌تواند به درک عمیق‌تر مسیرهای مولکولی دخیل در PCOS کمک کند و زمینه را برای توسعه درمان‌های هدفمند فراهم آورد.

References

- 1) Boots C.E. & Jungheim E.S. (2015) Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. *Semin Reprod Med* 33, 270-5.
- 2) Reddy K.R., Deepika M., Supriya K., Latha K.P., Rao S.L., Rani V.U. & Jahan P. (2014) CYP11A1 microsatellite (tttta) n polymorphism in PCOS women from South India. *Journal of assisted reproduction and genetics* 31, 857-63.
- 3) Agarwal V.R., Ashanullah C.I., Simpson E.R. & Bulun S.E. (1997) Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82, 70-4.
- 4) Itmäe S., Haller K., Peters M., Saare M., Hovatta O., Stavreus-Evers A., Velthut A., Karro H., Metspalu A. & Salumets A. (2009) Aromatase gene (CYP19A1) variants, female infertility and ovarian stimulation outcome: a preliminary report. *Reproductive biomedicine online* 18, 651-7.
- 5) Barber T.M. & Franks S. (2021) Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology* 95, 531-41.
- 6) Chittenden B., Fullerton G., Maheshwari A. & Bhattacharya S. (2009) Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reproductive biomedicine online* 19, 398-405.
- 7) Convisar S., Armouti M., Fierro M.A., Winston N.J., Scoccia H., Zamah A.M. & Stocco C. (2017) Regulation of AMH by oocyte-specific growth factors in human primary cumulus cells. *Reproduction* 154, 745-53.
- 8) Zhang C.-w., Zhang X.-l., Xia Y.-j., Cao Y.-x., Wang W.-j., Xu P., Che Y.-n., Wu X.-k., Yi L. & Gao Q. (2012) Association between polymorphisms of the CYP11A1 gene and polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Molecular biology reports* 39, 8379-85.
- 9) Bulun S.E., Sebastian S., Takayama K., Suzuki T., Sasano H. & Shozu M. (2003) The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 86, 219-24.
- 10) Dadachanji R., Shaikh N. & Mukherjee S. (2018) Genetic variants associated with hyperandrogenemia in PCOS pathophysiology. *Genetics research international* 2018.
- 11) Franks S. & McCarthy M. (2004a) Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 5, 69-76.
- 12) Panghiyangani R., Soeharso P., Andrijono D.A.S., Wiweko B., Kurniati M. & Pujiyanto D.A. (2020) CYP19A1 gene expression in patients with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences* 13, 100.
- 13) Franks S. & McCarthy M. (2004b) Genetics of ovarian disorders: polycysticovarysyndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 5, 69-76.

- 14) Franks S., McCarthy M.I. & Hardy K. (2006) Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl* 29, 278-85; discussion 86-90.
- 15) Menke M.N. & STRAUSS III J.F. (2007) Genetics of polycystic ovarian syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology* 50, 188-204.
- 16) Panghiyangani R., Soeharso P., Andrijono D.A.S., Wiweko B., Kurniati M. & Pujianto D.A. (2020) CYP19A1 gene expression in patients with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences* 13, 100.
- 17) Qin K., Ehrmann D.A., Cox N., Refetoff S. & Rosenfield R.L. (2006) Identification of a functional polymorphism of the human type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase gene associated with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91, 270-6.
- 18) Quinkler M., Sinha B., Tomlinson J.W., Bujalska I.J., Stewart P.M. & Arlt W. (2004) Androgen generation in adipose tissue in women with simple obesity—a site-specific role for 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Journal of Endocrinology* 183, 331-42.
- 19) Rak A., Drwal E., Karpeta A. & Gregoraszczuk E.L. (2015) Regulatory role of gonadotropins and local factors produced by ovarian follicles on in vitro resistin expression and action on porcine follicular steroidogenesis. *Biology of reproduction* 92, 142, 1-14.
- 20) Shozu M., Sebastian S., Takayama K., Hsu W.-T., Schultz R.A., Neely K., Bryant M. & Bulun S.E. (2003) Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *New England Journal of Medicine* 348, 1855-65.
- 21) Emami N., Moini A., Yaghmaei P., Akbarinejad V., Shahhoseini M. & Alizadeh A. (2021) Differences in expression of genes related to steroidogenesis in abdominal subcutaneous adipose tissue of pregnant women with and without PCOS; a case control study. *BMC pregnancy and childbirth* 21, 1-10

Original Article

Study of *CYP19a1* and *17beta_HSD* gene expression in polycystic ovary syndrome in a mouse model (*mus musculus*)

Received: 20/07/2024 - Accepted: 10/05/2025

Roxana Rahmani¹
Soheila Talesh Sasani^{2*}

¹Master's Student, Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

²Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (Corresponding Author)

Email: sohilataleshsasani@gmail.com

Abstract

Introduction: Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders in women of reproductive age, characterized by hormonal imbalances, ovulatory dysfunction, and morphological changes in the ovaries. Understanding the molecular mechanisms of this disease, especially the pathways related to steroidogenesis, is crucial for improving diagnosis and developing targeted therapies.

Methods: This study aimed to investigate the expression patterns of two key steroidogenesis genes—*CYP19A1* (encoding the aromatase enzyme) and *17β-HSD* (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase)—in a mouse model of PCOS. Thirty-five female NMRI mice were divided into three groups: control (n=5), treated with testosterone enanthate (n=15), and treated with estradiol valerate (n=15). After 25 days of treatment, blood and ovarian samples were collected, and gene expression was assessed using Real-Time PCR. Histological analyses and quantification of ovarian structure were also performed.

Results: The results demonstrated a significant increase in *CYP19A1* and *17β-HSD* expression in the treated groups ($P < 0.0001$). While these findings indicate the involvement of these genes in the manifestations of the PCOS mouse model, clinical studies are necessary to validate them as non-invasive biomarkers in humans.

Keywords: Polycystic Ovary Syndrome, *CYP19A1* gene, *17β-HSD* gene, steroidogenesis, mouse model, testosterone enanthate, biomarker, gene expression.

Acknowledgement: There is no conflict of interest