Journal of
Arak University of Medical Sciences

June & July 2020. Vol 23. Issue 2

Research Paper

The Effects of L-dopa, SCH23390 Hydrochloride and Sulpiride on Adiponectin and Luteinizing Hormone Levels in an Animal Model of Polycystic Ovary Syndrome

Khadijeh Haghighat Gollo[1], *Fariba Mahmoudi[1], Abolfazl Bayrami[1], Saber Zahri[1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Haghighat Gollo Kh, Mahmoudi F, Bayrami A, Zahri S. [The Effects of L-dopa, SCH23390 Hydrochloride and Sulpiride on Adiponectin and Luteinizing Hormone Levels in an Animal Model of Polycystic Ovary Syndrome (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(2):162-171. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5015.1

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5015.1

CC BY NC

Article Info:
Received: 03 Dec 2019
Accepted: 18 Feb 2020
Available Online: 01 Jun 2020

Key words:
L-dopa, Adiponectin, Polycystic ovary syndrome, Sulpiride, SCH23390

ABSTRACT

Background and Aim In patients suffer from Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), the secretion of the Luteinizing Hormone (LH) increases while adiponectin secretion and dopamine release decreases. Dopamine and adiponectin exert inhibitory effecs on LH secretion. In the present study the effects of L-dopa and dopamine receptor antagonists were investigated on LH secretion and adiponectin gene expression of in PCOS model rats to determine whether dopaminergic pathway might be involved in the decreasing LH via affecting adiponectin.

Methods & Materials Following estradiol valerate- induced PCOS, fifteen PCOS rats were divided into 3 groups including saline receiving group, L-dopa(100 mg/kg) or simultaneous injections of sulpride(10 mg/kg), SCH23390 hydrochloride (1 mg/kg) and L-dopa(100 mg/kg), Five intact rats received saline as negative control group. Blood samples were collected via tail vein. Ovary and hypothalamus were dissected and frozen. Serum concentration of LH and relative gene expression of adiponectin in ovary and hypothalamus were determined by radioimmunoassay and real time-PCR method.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Committee of University of Mohaghegh Ardabili (Code: 95.125.1).

Results Induction of PCOS caused a significant increase in mean serum concentration of LH and a significant decrease in mean relative gene expression of ovarian and hypothalamic adiponectin compared to control group. L-dopa caused a significant decrease in serum concentration of LH, a significant decrease in hypothalamic gene expression of adiponectin compared to PCOS rats. But it did not significantly increase ovarian adiponectin gene expression in comparison to PCOS rats. Dopamine receptor antagonists inhibit the effects of L-dopa on LH and hypothalamic gene expression of adiponectin.

Conclusion Dopaminergic signaling pathway may be involved in decreasing LH secretion via increasing hypothalamic adiponectin gene expression level in PCOS rats.

Extended Abstract

Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is associated with insulin resistance, elevated serum androgen levels, and an increase in the ratio of Luteinizing Hormone (LH) to Follicle-Stimulating Hormone (FSH) [1, 2]. Adiponectin is synthesized in adipose tissue, hypothalamus, and gonads [3, 4]. Deficiency in adiponectin production leads to insulin resistance and disruption in lipid and glucose metabolisms [7, 8]. Serum adiponectin levels in PCOS women are lower than in healthy individuals [8, 10]. L-dopa is a precursor to the neurotransmitters dopamine, epinephrine and norepi-

* *Corresponding Author:*
Fariba Mahmoud, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
Tel: +98 (914) 4190422
E-mail: f.mahmoudi@uma.ac.ir

nephrine [14]. Dopamine and L-dopa inhibit Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) axis activity [15, 16]. PCOS is associated with decreased dopamine release [19]. This study aimed to examine the effects of L-dopa and dopamine receptor antagonists (SCH 23390 as D1 receptor and sulperide as D2 receptor) on LH secretion and relative expression of adiponectin gene in the hypothalamus and ovaries of rats with PCOS induced by

Materials and Methods

To perform this study, 20 Wistar female rats weighing 180-220 g were used. In order to induce PCOS, the animals received intramuscular injection of Estradiol Valerate (EV) in the estrous stage. 15 PCOS rats were divided into three groups of saline, L-dopa (100 mg/kg), and L-dopa + sulpiride + SCH 23390 (100 mg/kg L-dopa + 10mg/kg sulpiride + 1mg/kg SCH 23390 hydrochloride), and 5 healthy rats received saline as negative control group. In groups receiving antagonist and L-dopa, antagonists were injected 10 minutes before L-dopa injection. The hypothalamus and ovarian samples were isolated and stored at -80°C until RNA extraction. The average serum LH concentration was measured using Radioimmunoassay (RIA). The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus was calculated using real-time PCR assay and delta-delta CT method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula). The data obtained from this formula were analyzed in SPSS V. 16 software using one-way ANOVA test and the mean data were compared by using Tukey's post-hoc test. The results were presented as Mean±SD, considering the significance level of $P \leq 0.05$.

Results

The results of comparing the mean serum LH concentrations in the negative control and PCOS groups are shown in Table 1. The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of the PCOS control group showed a significant decrease compared to the negative control group (P=0.001 for ovaries and P=0.015 for hypothalamus) (Figure 1). For the PCOS group received L-do-

Table 1. Comparing the mean serum LH concentrations in the negative control and PCOS groups

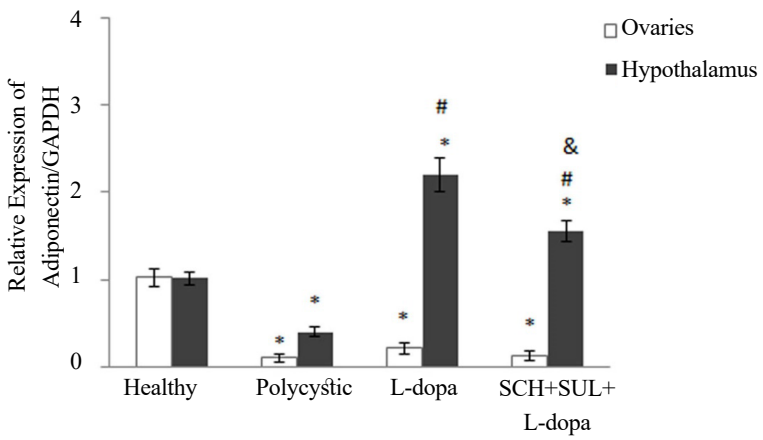
Groups	ng/ml
Negative control	2.9±0.14
PCOS control	5.08±0.11 *(P<0.001)
L-dopa	3.18±0.26 **(P<0.001)
L-dopa + sulpiride + SCH23390	3.95±0.14 *(P=0.003), **(P=0.002), ***(P=0.029)

* Compared to the negative control group;

** compared to the PCOS control group;

** compared to the L-dopa group

Journal of Arak University of Medical Sciences



Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 1. The mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of rats received saline, L-dopa only, and L-dopa plus sulpiride (SUL) and SCH 23390. * Compared to the healthy group; # compared to the PCOS control; &compared to the L-dopa group

pa only, the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus increased non-significantly (P=0.924) and significantly (P<0.001), respectively (Figure 1). For the PCOS group received L-dopa, sulpiride, and SCH 23390 hydrochloride simultaneously, the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus decreased non-significantly (P=0.948) and significantly (P=0.025), respectively (Figure 1).

Discussion

The results of the present study showed that in PCOS rats, serum LH concentrations increased significantly compared to the healthy rats, while the mean relative expression of adiponectin gene in the ovaries and hypothalamus of PCOS rats reduced significantly compared to the healthy rats. The results are consistent with previous research on the extent of adiponectin secretion in humans and rodents with PCOS. Previous studies have shown that the serum adiponectin level is reduced in women with PCOS compared to healthy peers, and PCOS obese women have lower serum levels than non-PICOS obese women [8, 22]. Decreased adiponectin levels in PCOS women may be due to increased production of androgens caused by reduced inhibitory effects of adiponectin on theca cells [23], because hyperandrogenism and obesity have been shown to play an important role in reducing plasma levels of adiponectin and causing insulin resistance, which is a major feature of PCOS [24, 25].

L-dopa exerted inhibitory effects on LH secretion and stimulatory effects on adiponectin gene expression in the hypothalamus of PCOS rats; however, it had no stimulatory effects on adiponectin gene expression in the ovaries of PCOS rats. This is consistent with the results of an in-vitro study where researchers examined the effects of dopamine on adipocyte cells incubated in culture, and reported the stimulatory effects of dopamine on adiponectin secretion from these cells [22]. Dopamine receptor antagonists including SCH23390 hydrochloride and sulpiride blocked the inhibitory effects of L-dopa on the LH secretion and its stimulatory effects on the relative expression of the adiponectin gene in the hypothalamus of PCOS rats. Increasing the activity of dopaminergic neurons may be effective in controlling endocrine disorders caused by decreased adiponectin secretion in PCOS patients.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study ethically approved in ethics committee of University of Mohaghegh Ardabili (Code: 95-125-1).

Funding

The present paper was extracted from the MSc thesis of the first author, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili.

Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Deputy of Research and Technology of the Mohaghegh Ardabili University for their financial and non-financial supports. Also thank to Dr. Homayoun Khaz'ali from Shahid Beheshti University for providing the instruments.

اثرات ال‌دوپا، SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید بر آدیپونکتین و هورمون لوتئینه‌کننده در مدل حیوانی در سندروم تخمدان پلی کیستیک

خدیجه حقیقت گللو[۱]، *فریبا محمودی[۱]، ابوالفضل بایرامی[۱]، صابر زهری[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۲ آذر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۲۹ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ خرداد ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:
ال‌دوپا، آدیپونکتین، سولپرید, PCOS, SCH23390

چکیده

زمینه و هدف در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) ترشح هورمون لوتئینه‌کننده (LH) افزایش و ترشح آدیپونکتین و آزادسازی دوپامین کاهش می‌یابد. دوپامین و آدیپونکتین اثرات مهاری بر ترشح LH دارند. در تحقیق حاضر اثرات تزریق ال‌دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین بر ترشح LH و بیان ژن آدیپونکتین در موش‌های صحرایی PCOS بررسی شد تا مشخص شود که آیا ممکن است مسیر دوپامینرژیکی از طریق تأثیر بر آدیپونکتین در کاهش LH دخیل باشد.

مواد و روش‌ها بعد از ایجاد PCOS با تزریق استرادیول والرات، پانزده موش صحرایی PCOS به سه گروه شامل گروه‌های دریافت‌کننده سالین، ۱۰۰ mg/kg ال‌دوپا یا تزریق هم‌زمان ۱۰ mg/kg سولپرید، ۱ mg/kg SCH23390 هیدروکلراید و ۱۰۰ mg/kg ال‌دوپا تقسیم شدند. پنج موش صحرایی سالم به عنوان کنترل منفی، سالین را دریافت کردند. غلظت سرمی LH با روش رادیوایمنواسی و بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس با روش ریل تایم PCR اندازه‌گیری شد.

ملاحظات اخلاقی این تحقیق در کمیته پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی (کد: ۱-۱۲۵-۹۵) تأیید شده است.

یافته‌ها القای PCOS سبب افزایش معنی‌دار میانگین غلظت سرمی LH و کاهش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس در مقایسه با گروه کنترل شد. تزریق ال‌دوپا سبب کاهش معنی‌دار غلظت سرمی LH و افزایش معنی‌دار بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس در مقایسه با گروه PCOS شد؛ ولی آن بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان را به طور معنی‌داری افزایش نداد. آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین اثرات ال‌دوپا بر LH و بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس را مهار کردند.

نتیجه‌گیری مسیر پیام‌رسانی دوپامینرژیکی ممکن است تاحدودی از طریق افزایش بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس در کاهش ترشح LH در موش های صحرایی PCOS دخیل باشد.

زمینه و هدف

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یکی از مهم‌ترین عوامل اختلال در تخمک‌گذاری و ناباروری زنان است که با علائمی نظیر سیکل‌های قاعدگی نامنظم (الیگوآمنوره) یا عدم تخمک‌گذاری (آمنوره)، افزایش سطوح سرمی آندروژن‌ها و افزایش نسبت هورمون لوتئینه‌کننده (LH) به هورمون محرک فولیکولی (FSH) همراه است [۱، ۲].

آدیپونکتین در بافت چربی، هیپوتالاموس، گنادها، عضلات اسکلتیپ و قلب سنتز می‌شود [۳، ۴]. آدیپونکتین اثرات فیزیولوژیکی خود را از طریق اتصال به دو گیرنده AdipoR1 و AdiopoR2 اعمال می‌کند. گیرنده‌های آدیپونکتین در عضلات اسکلتی، قلب، کبد، مغز، سلول‌های بتا پانکراس، بیضه، سلول‌های تکا و گرانولوزای تخمدان بیان می‌شوند [۳، ۴]. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سطوح پلاسمایی آدیپونکتین در افراد چاق، بیماران دیابتی و قلبی-عروقی پایین‌تر از افراد سالم است [۶، ۵]. نقص در تولید آدیپونکتین منجر به ایجاد مقاومت به انسولین، عدم تحمل گلوکز و اختلال در متابولیسم لیپیدها می‌شود [۷، ۸]؛ در حالی که آگونیست‌های گیرنده آدیپونکتین به عنوان داروی درمانی برای بیماری‌های مرتبط با چاقی نظیر دیابت و سندرم متابولیک عمل می‌کنند [۳]. هورمون آدیپونکتین ترشح GnRH/LH را با فعال کردن مسیر پروتئین کیناز فعال‌شونده cAMP (AMPK) مهار می‌کند [۹] و سطوح سرمی آدیپونکتین در زنان PCOS کمتر از افراد سالم است [۸، ۱۰].

ال‌دوپا پیش‌ساز نوروترانسمیترهای دوپامین، اپی‌نفرین و

*نویسنده مسئول:
فریبا محمودی
نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۴۱۹۰۴۲۲ (۹۱۴) ۹۸+
پست الکترونیکی: f.mahmoudi@uma.ac.ir

نوراپی‌نفرین است که از اسیدآمینه L –تیروزین توسط تیروزین هیدروکسیلاز ایجاد می‌شود. نام‌های تجاری آن pharmaco-pa و madopar است و از نظر کلینیکی در درمان بیماری‌های مرتبط با کاهش آزادسازی دوپامین استفاده می‌شود[۱۱-۱۴]. هنگام تزریق محیطی، دوپامین به علت عدم توانایی عبور از سد خونی-مغزی نمی‌تواند مستقیماً روی دستگاه عصبی مرکزی اثر بگذارد، درحالی‌که پیش‌سازهای دوپامین (تیروزین یا ال‌دوپا) یا آگونیست‌های سنتتیک دوپامین نظیر SKF-38393 توانایی عبور از سد خونی مغزی را دارند [۱۴]. گیرنده‌های دوپامین روی ۵۰ درصد نورون‌های GnRH بیان می‌شوند. دوپامین و آگونیست‌های گیرنده‌های آن سبب مهار فعالیت هیپوتالاموس-هیپوفیز- گنادها (HPG) و کاهش آزادسازی GnRH/LH می‌شوند [۱۵، ۱۶]. همچنین نشان داده شده است که تخمدان انشعابات دوپامینی را دریافت می‌کند و گیرنده‌های دوپامین و آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در تخمدان و نواحی مختلف مغز بیان می‌شود [۱۷، ۱۸] و استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین سبب عدم تخمک‌گذاری و ایجاد مرحله استروس دائمی در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۷]. در افراد PCOS کاهش نسبی در میزان دوپامین مشاهده شده است که می‌تواند توضیحی برای افزایش ترشح GnRH و درنتیجه افزایش سطح سرمی LH در بیماران PCOS باشد [۱۹]. در تحقیق حاضر، اثرات تزریق داخل صفاقی ال‌دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی شامل SCH23390 هیدروکلراید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D_1 و سولپرید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D_2 بر ترشح هورمون LH و میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس و تخمدان در موش‌های صحرایی ماده مبتلا به PCOS القایی با استرادیول والرات بررسی شد.

مواد و روش‌ها

واحدهای آزمایشی: تحقیق حاضر از نوع تجربی بنیادی است. برای انجام این تحقیق، ۲۰ موش صحرایی ماده نژاد ویستار به وزن ۲۲۰-۱۸۰ گرم خریداری‌شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی استفاده شد. در تمامی مدت آزمایش، آب و غذای مخصوص موش صحرایی آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. دمای محل نگهداری حیوان در حد ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد بود و حیوانات همواره تحت شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بودند. شروع روشنایی ساعت ۷ صبح بود.

بررسی واژیناسیون و القای سندروم تخمدان پلی‌کیستیک: ابتدا موش‌ها به مدت دو هفته برای خو گرفتن به شرایط آزمایشگاه در قفس‌ها با آب و غذای کافی و دمای مناسب نگهداری شدند؛ سپس سیکل استروس آن‌ها به مدت دو هفته برای بررسی منظم بودن سیکل زیر نظر گرفته شد. پس از مشاهده دو دور سیکل استروس مرتب (به‌ترتیب پرو استروس، استروس، مت استروس و دی استروس) موش‌های صحرایی برای شروع آزمایش آماده شدند. برای القای پلی‌کیستیک، تزریق عضلانی استرادیول والرات (پودر تهیه‌شده از شرکت ابوریحان، ایران) با دوز ۲ میلی‌گرم در ۰/۲ میلی‌لیتر روغن کنجد (شرکت باریج اسانس، ایران) در مرحله استروس انجام شد. موش‌ها به مدت ۶۰ روز در شرایط آزمایشگاهی با آب و غذای کافی قرار گرفتند. اسمیر واژنی برای بررسی القای PCOS صورت گرفت. از روز ۳۰ تثبیت حالت پلی‌کیستیک اتفاق افتاد و بر اساس بررسی‌های واژیناسیون و مشاهده مرحله استروس پایدار، القای PCOS تأیید شد.

تزریق داروها: برای انجام این آزمایش ۱۵ موش صحرایی PCOS به طور تصادفی به سه گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول سالین، گروه دوم ۱۰۰mg/kg ال‌دوپا (شرکت سیگما، آمریکا) و گروه سوم تزریق هم‌زمان ۱mg/kg SCH23390هیدروکلراید (شرکت سیگما، آمریکا)، ۱۰ mg/kg سولپرید و ۱۰۰mg/kg ال‌دوپا را در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر از طریق تزریق داخل صفاقی در بازه زمانی ۹/۳۰- ۹ صبح به مدت دو هفته دریافت کردند. پنج موش صحرایی که در مرحله استروس روغن کنجد را دریافت کرده بودند، بعد از ۶۰ روز به عنوان گروه کنترل منفی، تزریق داخل صفاقی سالین را دریافت کردند. قابل ذکر است که در گروه‌های دریافت‌کننده تزریق آنتاگونیست و ال‌دوپا، آنتاگونیست‌ها ۱۰ دقیقه قبل از ال‌دوپا تزریق شد. مقادیر ال‌دوپا و آنتاگونیست‌ها بر اساس تحقیقات پیشین انتخاب شده است [۲۰، ۲۱].

سنجش نمونه‌های سرمی: میانگین غلظت سرمی هورمون LH با استفاده روش رادیوایمنواسی (RIA) بر طبق دستورالعمل کیت سنجش هورمون LH ویژه موش صحرایی (Institute of Iso-topes Co., Hungary) اندازه‌گیری شد.

جداسازی نمونه‌های بافتی: حیوانات با استفاده از کتامین (۸۰ mg/Kg BW) زایلسین (۱۰mg/KgBW) بی‌هوش شدند. سر حیوانات جدا و جمجمه آن شکافته شد و مغز بلافاصله خارج گردید. سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گرفت و برشی به ضخامت ۴ mm حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کیاسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی-تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه شد. هیپوتالاموس و نمونه‌های تخمدانی راست جداشده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

بررسی میزان بیان ژنی با استفاده از روش ریل تایم-PCR: نمونه‌های هیپوتالاموسی و تخمدان با استفاده از pureZol (Bio Rad Co, U.S.A) و دستگاه هوموژنایزر هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم (Merck Co, Germany)، اپزوپروپانول (Merck Co, Germany) و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت pureZol (Bio Rad Co, U.S.A) استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Themo Sci-entific, U.S.A) تعیین شد. cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده یک میکروگرم RNA مطلق، ۱ میکرولیتر پرایمر الیگوتیمین (40Mμ)،

۱ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتید تری فسفات‌ها (10mMdNTP)، ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV (unit100) به همراه ۲ میکرولیتر بافر 10 X M-MuLV بر طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Vivantis Co., Malaysia) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد. تعیین سطح mRNA گلیسر آلدئید ۳ فسفو دهیدروژناز (GAPDH) توسط روش RT- PCR کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA آدیپونکتین استفاده شد.

پس از سنتز cDNA قطعات موردنظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت سایبرگرین ریل تایم پی‌سی‌آر شرکت تاکارا (Takara Bio Inc., Japan) و با استفاده از دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر روتر ژن مدل ۶۰۰۰ (Rotor Gene 6000, Cor- bette, Korea) تکثیر شدند. برنامه زمانی برای واکنش پی‌سی‌آر کمی شامل یک چرخه (C °۹۵ برای ۲ دقیقه) و ۴۰ چرخه (C °۹۵ برای ۵ ثانیه، C °۶۰ برای ۲۵ ثانیه و C °۶۰ برای ۲۰ ثانیه) بود. پرایمرها از شرکت ژن فناوران ایران تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتیسنس GAPDH و آدیپونکتین به‌ترتیب برابر با GAPDH sense: ′۵- AAGTTCAACGGCACAGTCAAG -3′ and GAPDH antisense: 5′- CATACTCAGCACCAGCATCAC -3′; adiponectin sense: 5′- AATCCTGCCCAGTCATGAAG -3′and adiponectin antisense: 5′- CATCTCCTGGGTCACCCTTA -3′. است. محصولات GAPDH و آدیپونکتین حاصل به‌ترتیب ۱۲۰ و ۲۱۴ جفت باز هستند. داده‌های به‌دست‌آمده برای تعیین بیان نسبی ژن آدیپونکتین نسبت به GAPDH با روش دلتا دلتا سی تی طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری: داده‌های حاصل از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با استفاده از نرم‌افزار SSPS (Version ۱۶) و با استفاده از آزمون آنوای یک‌طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی انجام شد. نتایج حاصل به صورت میانگین±انحراف معیار میانگین±SEM ارائه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شد. در تمام آنالیزهای آماری نتایج با $P\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار گزارش شدند.

نتایج

نتایج اثرات تزریق سالین، ال‌دوپا یا تزریق هم‌زمان SCH23390 هیدروکلراید، سولپرید و ال‌دوپا بر میانگین غلظت سرمی LH در گروه کنترل منفی و گروه‌های PCOS در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس گروه PCOS نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌دار نشان داد (P=۰/۰۰۱ برای تخمدان، P=۰/۰۱۵ برای هیپوتالاموس) (تصویر شماره ۱). میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس گروه PCOS دریافت‌کننده ال‌دوپا نسبت به گروه PCOS به‌ترتیب افزایش بی‌معنی (P=۰/۹۲۴) و افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) پیدا کرد (تصویر شماره ۱). در گروه تزریق هم‌زمان SCH23390 هیدروکلراید، سولپرید و ال‌دوپا میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس در مقایسه با گروه PCOS دریافت‌کننده ال‌دوپا به‌ترتیب کاهش بی‌معنی (P=۰/۹۴۸) و کاهش معنی‌دار (P=۰/۰۲۵) نشان داد (تصویر شماره ۱).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در موش‌های صحرایی PCOS غلظت سرمی LH در مقایسه با گروه کنترل منفی از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS در مقایسه با گروه کنترل منفی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج حاصل منطبق بر تحقیقات پیشین درباره میزان ترشح آدیپونکتین در وضعیت PCOS در انسان و جوندگان است. تحقیقات پیشین نشان داده است که غلظت سرمی آدیپونکتین در زنان مبتلا به PCOS در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و زنان چاق PCOS در مقایسه با زنان چاق غیر پلی‌کیستیک، سطوح سرمی کمتری از آن را دارند [۸، ۲۲]. کاهش سطح آدیپونکتین در زنان PCOS ممکن است در نتیجه افزایش تولید آندروژن‌ها به دلیل کاهش اثرات مهاری آدیپونکتین روی سلول‌های تکا باشد [۲۳]؛ زیرا نشان داده شده

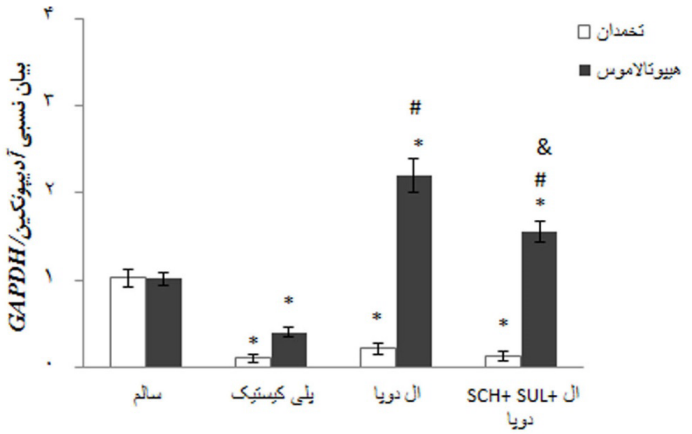
جدول ۱. میانگین غلظت سرمی هورمون لوتئینه(LH)

گروه‌ها	ng/ml
کنترل منفی	۲/۹±۰/۱۴
کنترل PCOS	۵/۰۸±۰/۱۱ (P<۰/۰۰۱)*
ال دوپا	۳/۱۸±۰/۲۶ (P<۰/۰۰۱)**
تزریق هم‌زمان ال دوپا، SCH۲۳۳۹۰ و سولپرید	۳/۹۵±۰/۱۴ (P=۰/۰۰۳)*، (P=۰/۰۰۲)**، (P=۰/۰۲۹)***

* در مقایسه با گروه کنترل منفی

** در مقایسه با PCOS

*** در مقایسه با گروه ال‌دوپا



تصویر ۱. میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین؛ *: در مقایسه با سالم؛ #: در مقایسه با PCOS؛ &: در مقایسه با ال دوپا

است که هیپرآندروژنیسم و چاقی در کاهش سطوح پلاسمایی آدیپونکتین و ایجاد مقاومت به انسولین نقش مهمی ایفا می‌کنند که از مشخصه‌های اصلیPCOS است [۲۴، ۲۵].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق ال‌دوپا سبب افزایش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس گروه PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل منفی می‌شود. تزریق ال‌دوپا میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین را در تخمدان موش‌های صحرایی PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل منفی به طور معنی‌داری افزایش نداد. نتایج حاصل منطبق بر تنها تحقیق موجود در مورد اثرات دوپامین بر ترشح آدیپونکتین است که در آن محققان اثرات دوپامین بر سلول‌های آدیپوسیت انکوبه‌شده در محیط کشت در شرایط in vitro را بررسی و درنتیجه اثرات تحریکی دوپامین بر ترشح آدیپونکتین از این سلول‌ها را گزارش کردند [۲۲]. همچنین نتایج حاضر نشان داد که تزریق هم‌زمان هر دو نوع آنتاگونیست شامل SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید به بلوکه کردن اثرات تحریکی ال‌دوپا بر میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS منجر می‌شود؛ درحالی‌که تزریق هم‌زمان هر دو نوع آنتاگونیست میانگین بیان نسبی ژن آدیپونکتین در تخمدان را تحت تأثیر قرار نداد.

در مورد نقش مسیر دوپامینرژیکی بر فعالیت مسیر عصبی آدیپونکتین اطلاعات زیادی در دسترس نیست و یافتن دقیق این مسیرها نیاز به تحقیقات آتی بیشتری دارد، ولی می‌توان بر اساس تحقیقات پیشین و در نظر گرفتن فاکتورهای اصلی دخیل در پاتوژنز PCOS نظیر هیپرآندوژنیسم، مقاومت به انسولین، افزایش ترشح پرولاکتین و غیره احتمال داد که مسیرهای عصبی واسطه‌ای مختلفی ممکن است در اعمال اثرات تحریکی ال‌دوپا بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس نقش داشته باشد [۲۳-۳۱]. پرولاکتین با مهار ترشح GnRH موجب مهار ترشح پالسی گنادوتروپین‌ها می‌شود [۲۶]. پرولاکتین همچنین روند سنتز آندروژن‌های آدرنال را تحریک می‌کند. افزایش آندروژن‌ها می‌تواند سبب افزایش وزن و پرمویی شود [۲۶]. دوپامین کنترل‌کننده مهاری پرولاکتین است و تزریق دوپامین موجب سرکوب پرولاکتین در مردان و زنان سالم و همچنین بیماران هیپرپرولاکتینمیا می‌شود [۲۲].

از طرفی نشان داده شده است که بین کاهش سطوح بیان آدیپونکتین و ایجاد مقاومت به انسولین ارتباط مستقیمی وجود دارد [۷،۸] و افزایش پرولاکتین منجر به ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود [۲۷]؛ همچنین نیلسون و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که پرولاکتین ترشح آدیپونکتین را در بافت چربی انسان در شرایط in vitro و در جوندگان در شرایط in vivo به‌طور قابل‌توجهی مهار می‌کند [۲۶]. با در نظر گرفتن یافته‌های این تحقیقات می‌توان فرض کرد که کاهش سنتز پرولاکتین با تزریق ال‌دوپا ممکن است یکی از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر بیان ژن آدیپونکتین در این تحقیق باشد.

با در نظر گرفتن اثر مهاری دوپامین بر آندروژن‌هایی مثل تستوسترون و استرادیول و با توجه به تحقیقات در زمینه تأثیر آندروژن‌ها بر غلظت آدیپونکتین سرم مشخص شده است که تزریق تستوسترون به مردان به طور مستقیم تولید آدیپونکتین را از بافت آدیپوسیت سرکوب می‌کند و نتایج نشان می‌دهد که آندروژن‌ها باعث کاهش آدیپونکتین پلاسما می‌شود و هیپوآدیپونکتینمیا ممکن است با خطرات احتمالی مقاومت به انسولین در مردان مرتبط باشد [۲۸، ۲۹]. پس کاهش آندروژن‌ها از طریق تزریق دوپامین می‌تواند یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر آدیپونکتین باشد. سطوح آدیپونکتین سرم به عنوان یك سیتوکین ضدالتهابی و ضددیابتی دارای ارتباط نزدیك با مقاومت به انسولین است و مطالعات از یک ارتباط معکوس بین آدیپونکتین و مقاومت به انسولین بحث می‌کنند.

با توجه به اینکه مقاومت به انسولین یکی از مؤلفه‌های اصلی PCOS محسوب می‌شود، به نظر می‌رسد بررسی ارتباط آدیپونکتین و انسولین کمک شایانی به چگونگی اثرات تحریکی

دوپامین بر ترشح آدیپونکتین در مدل‌های پلی‌کیستیک کند. انسولین به عنوان مهارکننده سطوح آدیپونکتین در انسان‌ها و حیوانات و تنظیم‌کننده ترشح آدیپونکتین شناخته شده است [۳۰]؛ همچنین نوعی ارتباط خطی منفی و معنی‌دار بین سطوح آدیپونکتین و گلوکز ناشتا مشاهده شده است. در این زمینه برگ و همکاران با استناد به یافته‌های خود اظهار داشتند که افزایش آنی در سطوح پلاسمایی آدیپونکتین موجب کاهش سطوح گلوکز پلاسما به واسطه مهار بیان آنزیم‌های گلوکونئوژنز کبدی در موش‌های دیابتی می‌شود [۳۱]؛ همچنین مطالعات پیشین اثرات مهاری انسولین بر آدیپونکتین را مطرح کرده‌اند [۳۰]؛ بنابراین کاهش ترشح انسولین توسط دوپامین را می‌توان مسیر واسطه مهم دیگری برای اثرات تحریکی مسیر دوپامینرژیکی بر بیان ژن آدیپونکتین در نظر گرفت. باوجوداین، برای یافتن نقش دقیق‌تر مسیر دوپامینرژیکی در کنترل ترشح و بیان ژن آدیپونکتین پیشنهاد می‌شود که اثرات تزریق بطن سوم مغزی یا تزریق داخل هسته قوسی (ARC) یا ناحیه پریاپتیک میانی دوپامین، آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مختلف گیرنده دوپامین بر میانگین غلظت سرمی و بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس و بافت چربی یا اثرات دوپامین بر نوروپپتیدهای کنترل‌کننده سنتز آدیپونکتین نظیر گرلین، کیسپپتین و غیره در موش‌های صحرایی PCOS بررسی شود.

نتیجه‌گیری

القای PCOS در موش‌های صحرایی سبب افزایش غلظت سرمی LH و کاهش بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان و هیپوتالاموس شد. ال‌دوپا اثرات مهاری بر ترشح LH و اثرات تحریکی بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS اعمال کرد. ال‌دوپا اثرات تحریکی بر بیان ژن آدیپونکتین در تخمدان موش‌های صحرایی PCOS نداشت. آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی شامل SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید اثرات مهاری ال‌دوپا بر ترشح LH و اثرات تحریکی آن بر بیان ژن آدیپونکتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS را بلوکه کرد. احتمال دارد که افزایش فعالیت نورون‌های دوپامینرژیکی در کنترل اختلالات اندوکرینی ناشی از کاهش ترشح آدیپونکتین در بیماران PCOS مؤثر واقع شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق را کمیته پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی (کد: ۱۲۵ - ۹۵) تأیید کرده است.

حامی مالی

نتایج این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری سرکار خانم خدیجه حقیقت گللو است. نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنند.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تضاد منافعی در این پژوهش وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند. همچنین نویسندگان از جناب آقای دکتر همایون خزعلی از دانشگاه شهید بهشتی برای تامین دستگاه‌ها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

[1] Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. J Endocrinol Invest. 2017; 40(1):1-8. [DOI:10.1007/s40618-016-0523-8] [PMID] [PMCID]

[2] Adgi Z, Talaei A, Mohamadi Kelishadi M. [The evaluation of the relationship between hirsutism and insulin resistance in patients with PCOS and idiopathic hirsutism (Persian)]. J Arak Univ Med Sci. 2011; 14(2):51-7. http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-953-en.html

[3] Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M, Szeszko k, Rytelewska E, Kisielewska K, et al. Adiponectin: A new regulator of female reproductive system. Int J Endocrinol. 2018; 2018:7965071. [DOI:10.1155/2018/7965071] [PMID] [PMCID]

[4] Davoodi B, Zilaei Bouri Sh, Ahangarpor A, Zilaei Bouri M. [Effects of two different physical exercises on plasma levels of adiponectin and resistin in obese and overweight young girls (Persian)]. J Arak Univ Med Sci. 2014; 17(4):27-37. http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-2206-en.html

[5] Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, et al. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. Endocrinology. 2007; 148(1):401-10. [DOI:10.1210/en.2006-1019] [PMID]

[6] Lee B, Shao J. Adiponectin and energy homeostasis. Rev Endocr Metab Disord. 2014; 15(2):149-56. [DOI:10.1007/s11154-013-9283-3] [PMID] [PMCID]

[7] Groth SW. Adiponectin and polycystic ovary syndrome. Biol Res Nurs. 2010; 12(1):62-72. [DOI:10.1177/1099800410371824] [PMID] [PMCID]

[8] Michalakis KG, Segars JH. The role of adiponectin in reproduction: From polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. Fertil Steril. 2010; 94(6):1949-57. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.05.010] [PMID] [PMCID]

[9] Cheng XB, Wen JP, Yang J, Yang Y, Ning G, Li XY. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. Endocrine. 2011; 39(1):6-12. [DOI:10.1007/s12020-010-9375-8] [PMID]

[10] Parillo F, Maranesi M, Mignini F, Marinelli L, Di Stefano A, Boiti C, et al. Evidence for a dopamine intrinsic direct role in the regulation of the ovary reproductive function: In vitro study on rabbit corpora lutea. PLoS One. 2014; 9(8):e104797. [DOI:10.1371/journal.pone.0104797] [PMID] [PMCID]

[11] Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: An update. Trends Neurosci. 2007; 30(5):194-202. [DOI:10.1016/j.tins.2007.03.006] [PMID]

[12] Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. Neurosci Biobehav Rev. 2000; 24(1):125-32. [DOI:10.1016/S0149-7634(99)00063-9]

[13] Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloche S, et al. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (Danio rerio) via three pituitary D2 receptor subtypes. Endocrinology. 2013; 154(2):807-18. [DOI:10.1210/en.2012-1759] [PMID]

[14] Zarabian M, Salehipour F, Ostad SN. The study of dose-response mitogenic effect of L-dopa on the human periodontal ligament fibroblasts cell. Acta Med Iran. 2004; 42(5):363-6. https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/2752

[15] Liu X, Herbison AE. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. Endocrinology. 2013; 154(1):340-50. [DOI:10.1210/en.2012-1602] [PMID]

[16] Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, et al. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. Endocrine. 2015; 50(3):783-96. [DOI:10.1007/s12020-015-0636-4] [PMID]

[17] Chaudhari N, Dawalbhakta M, Nampoothiri L. GnRH dysregulation in Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. Reprod Biol Endocrinol. 2018; 16(1):37. [DOI:10.1186/s12958-018-0354-x] [PMID] [PMCID]

[18] Ayano G. Dopamine: Receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: Review of literatures. J Ment Disord Treat. 2016; 2(2):1000120. [DOI:10.4172/2471-271X.1000120]

[19] Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, et al. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: Implications for OHSS development and treatment. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(8):2484-92. [DOI:10.1210/jc.2011-0075] [PMID]

[20] Andersson K, Fuxe K, Eneroth P, Härfstrand A, Agnati LF. Involvement of D1 dopamine receptors in the nicotine-induced neuro-endocrine effects and depletion of diencephalic catecholamine stores in the male rat. Neuroendocrinology. 1988; 48(2):188-200. [DOI:10.1159/000125007] [PMID]

[21] Grierson JP, James MD, Pearson JR, Wilson CA. The effect of selective D1 and D2 dopaminergic agents on sexual receptivity in the female rat. Neuropharmacology. 1988; 27(2):181-9. [DOI:10.1016/0028-3908(88)90169-4]

[22] Borcherding DC, Hugo ER, Idelman G, De Silva A, Richtand NW, Loftus J, et al. Dopamine receptors in human adipocytes: Expression and functions. PloS One. 2011; 6(9):e25537. [DOI:10.1371/journal.pone.0025537] [PMID] [PMCID]

[23] Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. Mol Cell Endocrinol. 2008; 284(1-2):38-45. [DOI:10.1016/j.mce.2008.01.007] [PMID]

[24] Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JI, Álvarez-Blasco F, Sanchón R, Luque-Ramírez M, et al. Adiponectin and resistin in PCOS: A clinical, biochemical and molecular genetic study. Hum Reprod. 2006; 21(9):2257-65. [DOI:10.1093/humrep/del146] [PMID]

[25] Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. Diabetes. 2002; 51(9):2734-41. [DOI:10.2337/diabetes.51.9.2734] [PMID]

[26] Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 331(4):1120-6. [DOI:10.1016/j.bbrc.2005.04.026] [PMID]

[27] Daimon M, Kamba A, Murakami H, Mizushiri S, Osonoi Sh, Yamaichi M, et al. Association between serum prolactin levels and insulin resistance in non-diabetic men. PLoS One. 2017; 12(4):e0175204. [DOI:10.1371/journal.pone.0175204] [PMID] [PMCID]

[28] Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. J Biol Chem. 2005; 280(18):18073-80. [DOI:10.1074/jbc.M414231200] [PMID]

[29] Page ST, Herbst KL, Amory JK, Coviello AD, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men. J Androl. 2005; 26(1):85-92. [DOI:10.1002/j.1939-4640.2005.tb02876.x]

Journal of
Arak University of Medical Sciences

[30] Giahi L, Djazayery A, Rahimy A, Rahmany M, Larijani B. Serum level of adiponectin and its association with insulin sensitivity in overweight diabetic and non-diabetic Iranian men. Iran J Public Health. 2008; 37(2):88-92. https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/2060

[31] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med. 2001; 7(8):947-53. [DOI:10.1038/90992] [PMID]