بررسی نقش آگونیست و آنتاگونیست گیرنده آدرنرژیک بتا-۲ در بیان ژن‌های اتصال شکافی (دو کانکسین ۳۷/۴۳) در سلول‌های کومولوس زنان با پاسخ ضعیف تخمدان

فریده ظفری زنگنه[1*]، صمد محمدنژاد[2]، محمد مهدی نقی‌زاده[3]، مریم باقری[1]، الناز حکمت[1]

۱- مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج)، بیمارستان ولیعصر ۲، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات سلول درمانی، پژوهشکده بیماری‌های گوارشی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، بیمارستان ولیعصر ۲، مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر (عج).
تلفن: ۶۶۵۸۱۶۱۶-۰۲۱
E-mail: zangeneh14@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۵ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۴ آنلاین: ۱۴۰۰/۱۱/۰۱

زمینه و هدف: کانکسن‌ها (Connexin) پروتیین غشایی در ساختار اتصال شکافی یا گپ جانکشن‌ها هستند که عهده‌دار انتقال یون‌ها و مولکول‌های پیام‌رسان به تخمک‌اند. هدف این مطالعه بررسی نقش گیرنده بتا-دو آدرنرژیک در روند رشد فولیکول براساس بیان ژن دو کانکسن (Connexin)، ۳۷ و ۴۳ گپ جانکشن‌هاست که نقش اولیه را در از سرگیری مجدد روند میوتیک و بلوغ اووسیت دارند.

روش بررسی: این مطالعه موردی-شاهدی از فروردین ۹۸ تا آبان ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات بهداشت باروری بیمارستان امام خمینی تهران در دو گروه مطالعه (زنان با پاسخ ضعیف تخمدان) و کنترل (زنان اهداکننده تخمک) انجام شد. هر گروه با معیار بولونیا (Bologna) و ضوابط ورود اندکس توده بدنی زیر ۲۸ m^2/kg و محدوده سنی ۴۵-۲۰ سال و ضوابط خروج عدم مصرف دارو به‌جز تحریک‌کننده‌های تخمدان و عدم ابتلا به بیماری وارد مطالعه شدند. سیکل تحریک تخمک‌گذاری اجرا و کومولوس‌ها پس از پانکچر جدا و در محیط کشت سلولی قرار گرفتند. ایزوپروترنول (آگونیست) و پروپرانولول (آنتاگونیست) گیرنده بتا-دو با غلظت ۱۰۰ nM به محیط اضافه و استخراج RNA انجام و cDNA سنتز گردید. بیان ژن توسط تکنیک Real-time PCR تعیین شد.

یافته‌ها: بیان ژن هر دو کانکسن (Connexin) در گروه مطالعه بدون دارو ($P<0/001$)، پروپانولول ($P<0/001$) و ایزوپروترنول ($P<0/001$) نسبت به گروه کنترل تغییر معنادار داشت. ایزوپروترنول سبب کاهش و پروپانولول منجر به افزایش بیان ژن گردید ($P<0/001$).

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که پاسخ ضعیف تخمدان با فعالیت گیرنده بتا-دو در تعامل معنادار است.

کلمات کلیدی: گیرنده بتا آدرنرژیک، سلول کومولوس، بیان ژن، دو کانکسن ۳۷ و ۴۳، زنان با پاسخ ضعیف تخمدان.

مقدمه

زنان نابارور با پیری زودرس تخمدان Premature ovarian insufficiency (POI) یا Premature ovarian failure (POF) درصد قابل توجهی از زنان نابارور را تشکیل می‌دهند، که این عدم کفایت تخمدانی سبب شده که تخمدان با پاسخ ضعیف یا Poor ovarian responders (POR) نیز معرفی شود. زوجین نابارور تقریبا ۱۰٪ جمعیت جهان را در سن باروری تشکیل می‌دهند و امروزه روش‌های فناوری کمک باروری توانسته است با افزایش کنترل روند رشد تخمک و برداشت آن، Assisted reproductive technologies (ART) گام اصلی را در درمان لقاح آزمایشگاهی Controlled ovarian hyperstimulation (COH) بردارد.

موفقیت لقاح آزمایشگاهی (IVF) به جذب کافی فولیکول با استفاده از تحریک کنترل شده تخمدان با گنادوتروپین‌ها بستگی دارد و شکست در جذب فولیکول‌های کافی (پاسخ ضعیف) نامیده می‌شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

پروتکل‌های درمانی مختلفی پیشنهاد شده‌اند که هدف آن‌ها افزایش پاسخ تخمدانی است. در این روند ضعف تخمدانی می‌توان علل کروموزوم- ژنتیکی، متابولیکی، آنزیماتیک، یاتروژنیک، سمی، خودایمن، عفونی و یا علل غیر قابل شناخت دیگر که همه آن‌ها یک چالش بزرگ برای اندوکرینولوژی تولید مثل و ناباروری به‌شمار می‌آیند را نام برد.[۱]

در بیمارانی که "پاسخ‌دهندگان ضعیف" تعریف شده‌اند، تعداد محدود تخمک‌های به‌دست آمده همچنان مشکل اصلی در بهینه‌سازی تولد نوزادان زنده می‌باشد. چرا که در مقابل تعداد تخمک‌های بازیابی شده، جنین‌های کمتری برای انتخاب و انتقال وجود داشته و متعاقبا این بیماران در مقایسه با پاسخ‌دهندگان طبیعی، میزان حاملگی پایین‌تری در هر انتقال خواهند داشت.

اگرچه مفهوم پاسخ ضعف تخمدان بیش از ۳۰ سال است که معرفی شده است، اما تا سال ۲۰۱۱ تعریف مشترکی از بیماران با پاسخ ضعیف وجود نداشت.[۲] از مهمترین عوامل پیش‌بینی‌کننده واکنش تخمدان به تحریکات هورمونی می‌توان سن، پارامترهای بیوشیمیایی: سطح پایه هورمون محرک فولیکول در فاز فولیکولی اولیه، هورمون آنتی‌مولرین سرم و خصوصیات مورفولوژیک و تعداد فولیکول‌های آنترال را نام برد.[۳]

امروزه مشخص شده است که عملکرد تخمدان توسط پیام یا سیگنال‌های هورمونی خارج و داخل تخمدانی می‌تواند به‌طور همزمان (Synchrony) رشد فولیکولی، ترشح استرویید و اوولاسیون را کنترل نماید.

یافته‌های چند سال اخیر نشان می‌دهد که سیستم سمپاتیک تخمدانی در رشد فولیکول و روند استرویدوژنزیس (Steroidogenesis) تخمدانی کاملا نقش موثر را به عهده دارد. برای مثال روند استرویدوژنزیس تخمدان در قلمرو فعالیت گیرنده بتا-دو آدرترژیک است و این فعالیت وابسته به عملکرد تنظیم‌کنندگی سطح cAMP دارد که منجر به تولید استرویید می‌شود.[۴،۵] همه این پیام‌ها یا سیگنال‌های تخمدانی و نهایتا رشد تخمک از طریق ارتباطات سلولی به نام گپ جانکشن‌ها به تخمک اطلاع‌رسانی می‌شوند.

یکی از انواع اتصالات سلولی گپ جانکشن‌ها پروتیین‌های غشایی هستند که راه ارتباطی بین سلول‌های کومولوس و تخمک را برای تغذیه و دیگر فرآیندهای سلولی فراهم می‌نمایند. هر کدام از این گپ‌ها یا اتصالات شکافی از شش سیلندر یا لوله پروتیینی تشکیل شده‌اند.

پس اتصالات شکافی یا گپ جانکشن‌ها یک اتصال بین سلولی است که سبب می‌شود سیتوپلاسم دو سلول به‌طور مستقیم بهم متصل شوند. آن‌ها به مولکول‌ها، یون‌ها و امواج الکتریکی اجازه می‌دهند تا به‌طور مستقیم از طریق یک اتصال یا یک دروازه تنظیم شده بین سلولی عبور کنند.

تاکنون ۲۱ عضو از آن‌ها در ژنوم انسان شناخته شده‌اند در پستانداران، گپ‌ها نقش اولیه در بلوغ اووسیت و از سرگیری مجدد روند میوتیک سرکوب شده را به عهده دارند که از طریق انتقال مولکول‌های متعدد کوچک (kDa≥۱) در بین سلول‌های کومولوس و اووسیت انجام می‌شود.

در مطالعه‌ای Santiquet و همکاران در گاو ماده نشان دادند که گنادوتروپین‌ها تنظیم‌کننده بیان ژن کانکسن (Connexin) ۴۳ هستند که تخریب و یا تمرکز آن را در کمپلکس کومولوس-اووسیت در ساعات اولیه بلوغ در محیط in-vitro را به عهده دارند.[۶]

کانکسین (Connexin) ۳۷ نیز در سلول‌های کومولوس کرونا رادیاتا (cells Corona radiata cumulus) بیان شده است، که اجازه می‌دهد کانال‌های Homomer/Homotypic بین سلول‌های کومولوس-اووسیت ایجاد شود.

فقدان کانکسین ۴۳ و یا کاهش بیان ژن آن درون سلول‌های Granulosa موجب کاهش رشد فولیکول وکاهش میزان باروری می‌گردد. کانکسن (Connexin) ۴۳ همچنین در سلول‌های کومولوس انسانی بیان می‌شود و در زمینه IVF با نتایج حاملگی نیز همبستگی نشان داده است، بنابراین، این کانکسن (Connexin) ممکن است تعیین‌کننده کیفیت تخمک و جنین در زنان باشد.[۷]

در حدود۴۰٪-۳۰ از علل ناباروری زنان مربوط به اختلال عملکرد تخمدان است. اگرچه عوامل عصبی عضلانی و رحمی ممکن است باروری را با افزایش سن زنان کاهش دهند، اما به‌نظر می‌رسد که عامل اصلی و مهم این مشکل، کاهش ذخایر فولیکول تخمدانی آن‌هاست. کاهش معنادار تعداد فولیکول‌های اولیه (Primordial) با افزایش سن می‌تواند از دو جنبه در کیفیت تخمک وعوامل جانبی آن تاثیرگذار باشد.

۱- آنیوپلوئیدی (Aneuploidy)، شکل‌گیری اسپیندل غیر طبیعی و ۲- سیتوپلاسم، با کاهش تعداد میتوکندری، ذخایر ATP و ناهنجاری‌های در ساختار سیتو اسکلت نوکلئوس را می‌توان نام برد.[۸] افزایش سن زنان به‌طور واضح با آنئوپلوئید اووسیت مرتبط است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

همچنین ناهنجاری‌های زونا پلوسیدا (Zona pellucida) نیز در اووسیت‌های ناشی از پاسخ‌دهندگان ضعیف مورد توجه می‌باشد.[۹]

هدف این مطالعه بررسی نقش گیرنده بتا-دو آدرنرژیک در روند رشد فولیکول براساس گپ جانکشن‌ها است که نقش اولیه در بلوغ اووسیت و از سرگیری مجدد روند میوتیک سرکوب شده را عهده دارند که بر روی سلول‌های کومولوس بیماران با پاسخ ضعیف تخمدان انجام شد. سلول‌های کومولوس نزدیک‌ترین سلول به اووسیت می‌باشند و بنابراین اتصالات سلولی بین آن‌ها و اووسیت مهمترین معبر اطلاع‌رسانی در جهت رشد فولیکول است.

روش بررسی

این مطالعه موردی-شاهدی از فروردین ۹۸ تا آبان ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات بهداشت باروری بیمارستان امام خمینی تهران بر روی دو گروه مطالعه (زنان با پاسخ ضعیف تخمدان) و کنترل (زنان اهداکننده تخمک) انجام شد.

هر دو گروه با ضوابط ورود اندکس توده بدنی زیر m^2/kg ۲۸ و محدوده سنی ۴۵-۲۰ سال و ضوابط خروج، عدم مصرف دارو به‌جز تحریک‌کننده‌های تخمدان و هم‌چنین عدم ابتلا به بیماری بود. تشخیص بیماری با معیار بولونیا (Bologna) انجام شد. سیکل تحریک تخمک‌گذاری اجرا و سپس پس از پانکچر، کومولوس‌ها جدا و در محیط کشت سلولی وارد شدند. ایزوپروترنول (Isoproterenol) (آگونیست از شرکت دارویی ایتالیایی Monico) و پروپرانولول (Propranolol) (آنتاگونیست از شرکت ایرانی تولید دارو) با غلظت nM ۱۰۰ به‌عنوان داروهای انتخابی گیرنده بتا-دو به محیط کشت اضافه شدند. پس از اتمام مراحل کشت، استخراج RNA انجام و غلظت با دستگاه Nano drop خوانده شد و cDNA سنتز گردید.

بیان ژن توسط تکنیک Real-time PCR تعیین شد. در این مطالعه دو گروه سه‌تایی یا شش گروه داشتیم شامل: یک گروه سه‌تایی کنترل یکی بدون دارو و دو گروه با دارو. گروه سه‌تایی دوم مربوط به تخمدان پاسخ ضعیف که یک گروه آن بدون دارو و دو گروه دیگر با دارو بودند.

آنالیز داده‌ها: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS software, version 26 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد. یافته‌ها با استفاده از میانگین و میانه در کنار انحراف معیار نمایش داده شد و از آزمون تعقیبی توکی (Tukey post hoc test) پس از انجام آنالیز واریانس (ANOVA) برای تحلیل استفاده شد. برای اطمینان از وجود تفاوت سطح معناداری کمتر از ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد (P<۰/۰۰۱).

یافته‌ها

یافته مورفولوژیک سلولی: سلول‌های کومولوس در دو گروه کنترل، Poor پس از کشت اولیه و پاساژ اول مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. با توجه به زمان رشد سلول‌ها، ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه سلول‌ها از چسبندگی سلولی مناسب و مورفولوژی سلول‌های کومولوس در حالت کشت سلولی برخوردار بودند.

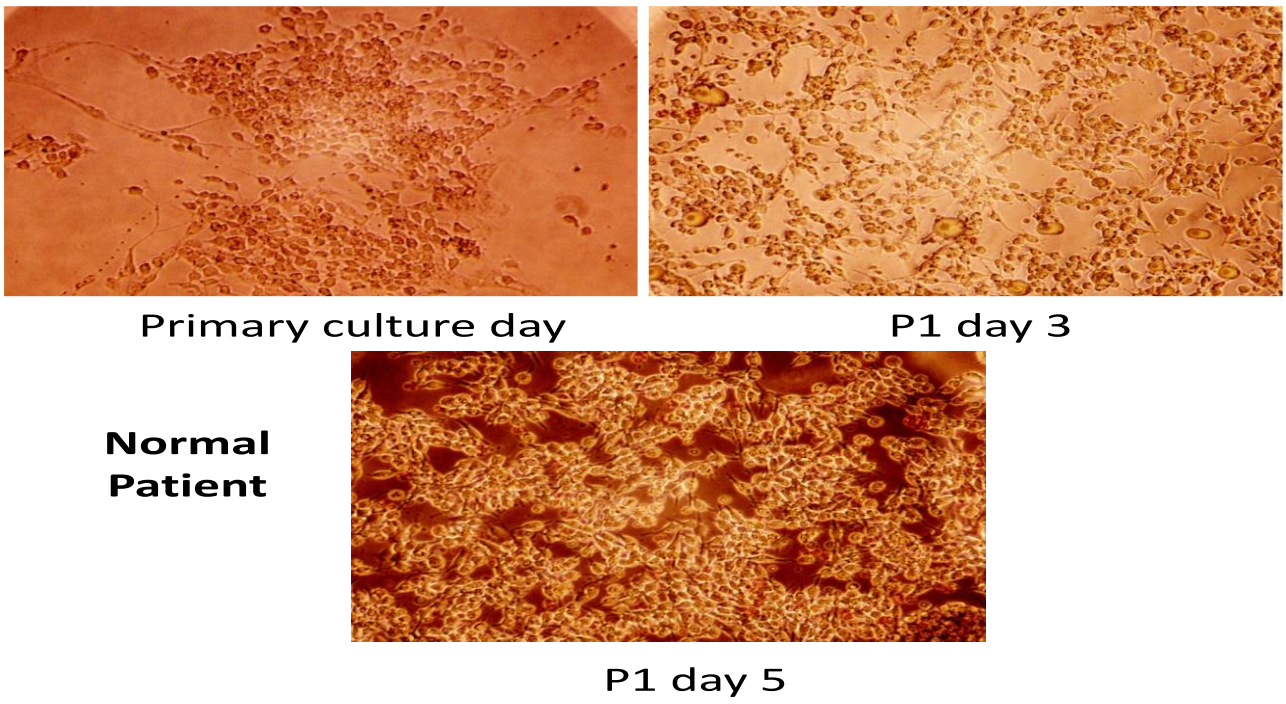
پس از ۸۰٪ پر شدن سطح پلیت و پاساژ سلول‌ها، سلول‌ها قدرت چسبندگی و تکثیر را حفظ کرده‌اند و قابلیت برنامه‌ریزی برای گروه‌بندی و تیمار با دارو را در روز پنجم نشان دادند. تصاویر زیر نمایانگر مورفولوژی سلول‌ها می‌باشد. همان‌گونه که در تصاویر مشهود است موروفولوژی سلول‌ها به‌طور کلی در دو گروه یکسان ولی تفاوت در کیفیت سلول‌ها به‌خوبی مشهود می‌باشد. (شکل ۱ و ۲).

آنالیز بیان ژن‌ها در سطح mRN

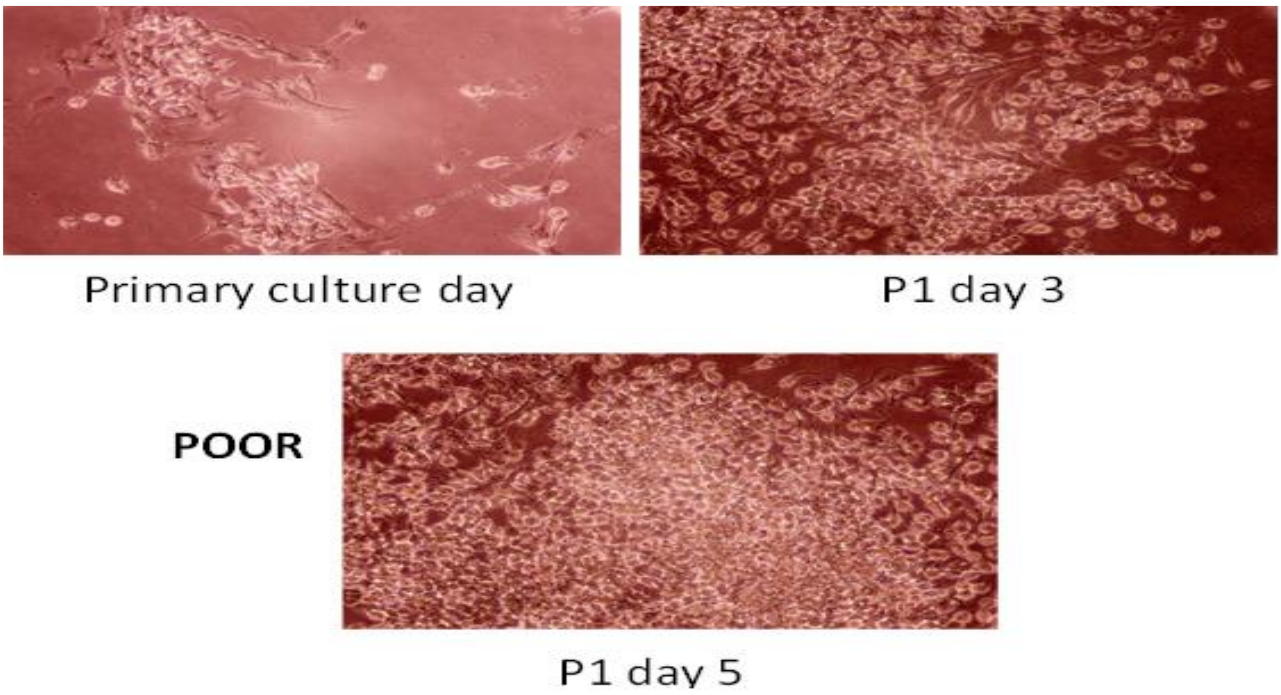
ژن کانکسن (Connexin) ۴۳: نسبت تغییرات بیان ژن کانکسن (Connexin) ۴۳ در جدول ۱ نمایش داده شده است. براساس یافته‌ها بیان ژن در گروه کنترل در نتیجه مداخله ایزوپرترنول کاهش معنادار داشت (P<۰/۰۰۱) اما در نتیجه مداخله پروپرانولول تفاوتی نداشت (P=۰/۹۹۶).

در گروه مطالعه زنان با پاسخ ضعیف تخمدانی، بیان ژن در گروه مداخله با ایزوپروترنول نسبت به گروه بدون مطالعه کاهش معنادار (P<۰/۰۰۱) نشان داد، در حالی‌که مداخله پروپانولول منجر به افزایش بیان ژن در مقایسه با گروه بدون مداخله شد (P<۰/۰۰۱). برای این مقایسه از Tukey post hoc test پس از آنالیز ANOVA استفاده شده و سطح معنادار P<۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]



شکل ۱. تصویر مورفولوژی گروه کنترل پس از کشت اولیه، پاساژ اول (سه روز) و پاساژ دوم (پنج روز).



شکل ۲: تصویر مورفولوژی گروه تخمدان پاسخ ضعیف پس از کشت اولیه، پاساژ اول (سه روز) و پاساژ دوم (پنج روز)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

ژن کانکسن (Connexin) ۳۷: نسبت تغییرات بیان ژن کانکسن (Connexin) ۳۷ در جدول ۲ نمایش داده شده است. براساس یافته‌ها بیان ژن در گروه کنترل در نتیجه مداخله ایزوپرترنول کاهش معنادار داشت (P<۰/۰۰۱). اما در نتیجه مداخله پروپرانولول تفاوتی نداشت (P=۰/۰۰۶). در گروه بیماران پاسخ ضعیف بیان ژن در گروه مداخله پروپانولول منجر به افزایش بیان ژن در مقایسه با گروه بدون مداخله شد (P<۰/۰۰۱). در حالی‌که مداخله ایزوپروترنول منجر به کاهش معنادار بیان ژن گردید (P<۰/۰۰۱). برای این مقایسه از Tukey post hoc test پس از آنالیز ANOVA استفاده شده و سطح معنادار P<۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

بحث

کنترل تحریک زیاد (Hyper stimulation) تخمدانی یک گام اصلی و مدیریتی در درمان توسط فناوری کمک باروری در لقاح آزمایشگاهی (IVF) به‌شمار می‌آید که با هدف برداشت تخمک‌های قابل توجه صورت می‌گیرد. این بیماران معمولا زنان دارای سن نسبتا بالا هستند با ذخیره تخمدان کاهش یافته است. البته این پاسخگویی ضعیف در جوانترها هم قابل مشاهده است که با علل غیر قابل شناخت همراه است و البته یک چالش بزرگ در اندوکرینولوژی تولید مثل به‌شمار می‌آید.

جدول۱: تغییرات بیان ژن کانکسن (Connexin) ۴۳ در دو گروه کنترل و تخمدان پاسخ ضعیف در معرض ایزوپرترنول و پروپرانولول

	Cx43($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			معناداری[۱]	معناداری[۲]	معناداری[۳]
	تعداد	میانگین	انحراف معیار	میانه			
تخمدان نرمال بدون تیمار	۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	<۰/۰۰۱		
تخمدان پاسخ ضعیف بدون تیمار	۳	۰/۳۱۳	۰/۰۱۷	۰/۳۰۹			
تخمدان نرمال ایزوپرترنول	۳	۰/۶۳۸	۰/۰۲۴	۰/۶۴۹	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
تخمدان پاسخ ضعیف ایزوپرترنول	۳	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷			<۰/۰۰۱
تخمدان نرمال پروپرانولول	۳	۱/۰۱۳	۰/۰۲۳	۱/۰۱۲		۰/۹۹۶	
تخمدان پاسخ ضعیف پروپرانولول	۳	۰/۵۰۵	۰/۰۱۷	۰/۵۱۵	<۰/۰۰۱		<۰/۰۰۱

معناداری[۱]: مقایسه بین تخمدان نرمال و پاسخ ضعیف. معناداری[۲]: مقایسه با تخمدان نرمال بدون تیمار. معناداری[۳]: مقایسه با تخمدان پاسخ ضعیف بدون تیمار. کلیه معناداری‌های از Tukey post hoc test پس از انجام آنالیز ANOVA استخراج شده است و مقادیر پررنگ از نظر آماری معنادار هستند (P<۰/۰۰۱).

جدول۲: تغییرات بیان ژن کانکسن (Connexin) ۳۷ در دو گروه کنترل و تخمدان پاسخ ضعیف در معرض ایزوپرترنول و پروپرانولول

	Cx37($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			معناداری[۱]	معناداری[۲]	معناداری[۳]
	تعداد	میانگین	انحراف معیار	میانه			
تخمدان نرمال بدون تیمار	۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	<۰/۰۰۱		
تخمدان پاسخ ضعیف بدون تیمار	۳	۰/۳۰۸	۰/۰۲۴	۰/۳۰۷			
تخمدان نرمال ایزوپرترنول	۳	۰/۶۴۱	۰/۰۵۸	۰/۶۵۳	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
تخمدان پاسخ ضعیف ایزوپرترنول	۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲			<۰/۰۰۱
تخمدان نرمال پروپرانولول	۳	۰/۹۰۱	۰/۰۳۵	۰/۹۰۵		۰/۰۰۶	
تخمدان پاسخ ضعیف پروپرانولول	۳	۰/۵۷۰	۰/۰۲۱	۰/۵۸۱	<۰/۰۰۱		<۰/۰۰۱

معناداری[۱]: مقایسه بین تخمدان نرمال و پاسخ ضعیف. معناداری[۲]: مقایسه با تخمدان نرمال بدون تیمار. معناداری[۳]: مقایسه با تخمدان پاسخ ضعیف بدون تیمار. کلیه معناداری‌های از Tukey post hoc test پس از انجام آنالیز ANOVA استخراج شده است و مقادیر پر رنگ از نظر آماری معنادار هستند (P<۰/۰۵).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

نقش سیستم عصبی سمپاتیک در دو روند مهم استرویدوژنزیس و فولیکوژنزیس (Folliculogenesis) تخمدانی شناخته شده و بسیار حایز اهمیت است. سلول‌های کومولوس نزدیک‌ترین سلول‌ها به تخمک می‌باشند که توسط اتصالات سلولی یا گپ جانکشن بهم ارتباط دارند.

امروزه نقش این اتصالات در قلب و بررسی آن‌ها در مشکلات و آریتمی‌های قلبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است و گزارشات چندی در رابطه با نقش این اتصالات توسط گیرنده بتا–دو آدرنرژیک در دسترس است.[۱۰]

این مطالعه به‌دنبال یافته‌های مطالعاتی پیشین با همین دیدگاه طراحی شد. گپ جانکشن در سلول‌های کومولوس در روند اووژنزیس (Oogenesis) مهم است و گزارشات در موش نشان می‌دهد که عدم کفایت این اتصالات سبب اختلال در روند اووژنزیس می‌گردد.[۱۱]

مهمترین سیگنال یا پیام انتقالی که توسط گپ جانکشن‌ها از سلول‌های کومولوس به اووسیت می‌رسند پیامبران ثانویه می‌باشند که جهت رشد و تکامل تخمک برای باروری ضرورت تام دارند. بیشترین مطالعات روی cGMP/cAMP آدنوزین و گوآنوزین مونو فسفات می‌باشد که در موش صورت گرفته است.

دراووسیت پستانداران، عدم فعالیت (Maturation promoting factor (MPF و تحریک cAMP سبب توقف فاز میوتیک می‌شود. برای مثال در طی مرحلهٔ بلوغ موش، در شرایط vivo، LH باعث کاهش سطح گوانوزین مونو فسفره حلقوی (cGMP) در سلول‌های گرانولوزای میورال و اووسیت می‌شود که به نوبه خود کمک می‌کند به مهار فسفودی استراز A۳، به‌وسیله هیدرولیز کردن cAMP به AMP و فعال شدن MPF، و در نهایت تجزیه غشایی ژرمینال (GVBD) رخ می‌دهد.[۱۲]

از نقطه نظر سلولی–مولکولی در حقیقت در دوران جنینی این cAMP است که کنترل پیشرفت میوتیک را به عهده دارد و در ایجاد فولیکول پریموردیال نقش اصلی را به عهده دارد. به عبارت دیگر، این پیامبر ثانویه، کنترل‌کننده روند فولیکولوژنزیس (Folliculogenesis) پریموردیال و پروفازمیوتیک ۱ در اووسیت موش می‌باشد.[۱۳]

در تخمک پستانداران مرحلهٔ میوزیس متوقف شده تا زمان فعال شدن هورمون لوتئینزه (LH) در سلول‌های گرانولوزا ادامه می‌یابد. بنابراین مسئولیت cGMP در سلول‌های گرانولوز حفظ توقف مرحله میوزیس ست تا در بلوغ LH فعال گردد. مطالعات نشان می‌دهد که این پیام‌بران ثانویه در ارتباطات متقابل شکاف‌های میان سلولی یا گپ جانکشن‌های کومولوس–اووسیت دخیل هستند تا شروع مجدد فعالیت oocyte را تحت تاثیر قرار دهند.

cAMP تولید شده در سلول‌های کومولوس از طریق اتصالات شکافی به تخمک منتقل می‌شود.[۱۴] با توجه به این‌که رشد تخمک در روند میوزیس متوقف می‌شود حضور هورمون‌های گنادو تروپینی FSH و LH با افزایش تولید آدرنوزین سیکل ۳، ۵ مونو فسفره cAMP و فعال‌سازی بعدی پروتیین کیناز فعال (MAPK) Mitogen-activated protein kinase در سلول‌های کومولوس اطراف گرانولوزا به شدت در بلوغ تخمک تاثیرگذار است ولی درک دقیق روند سیگنالینگ این هورمون‌ها نیاز به بررسی بیشتر در روند رشد و بلوغ تخمک دارد.[۱۵]

نتایج پژوهش Thomas و همکاران نشان داد که درمان‌هایی که می‌توانند سطوح cAMP را در سلول‌های کومولوس حفظ یا افزایش دهند، می‌توانند سبب ارتباط طولانی مدت سلول‌های تخمک کومولوس و تاخیر در شروع مرحله میوتیک شوند.[۱۶]

مطالعه Appeltant و همکاران نیز تاکید داشت که نگهداری افزایش سطح cAMP در تخمک طی نیمه اول IVM، بلوغ تخمک را بهبود بخشیده و منجر به افزایش پاسخ پس از جداسازی ماتریکس کومولوس در IVF می‌شود.

تحقیقات اخیر نشان داده است که اضافه کردن فاکتورهای مترشحه تخمک Oocyte-secreted factors (OSF) در طی IVM، توانایی رشد تخمک‌های حاصل از فولیکول‌های کوچک را افزایش می‌دهد که این تحریک از طریق افزایش گیرنده EGF یا فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) صورت می‌گیرد.[۱۷]

این مطالعات نشان می‌دهد که آغاز همه این مراحل برای دستیابی به یک فولیکول آنترال قابل باروری است که با شروع فعالیت cAMP آغاز می‌شود. حضور فعال گنادوتروپین‌ها در مرحله تنظیمات لوکال داخل سلولی نیز در روند بلوغ تخمک تاثیر تام دارد.[۱۸]

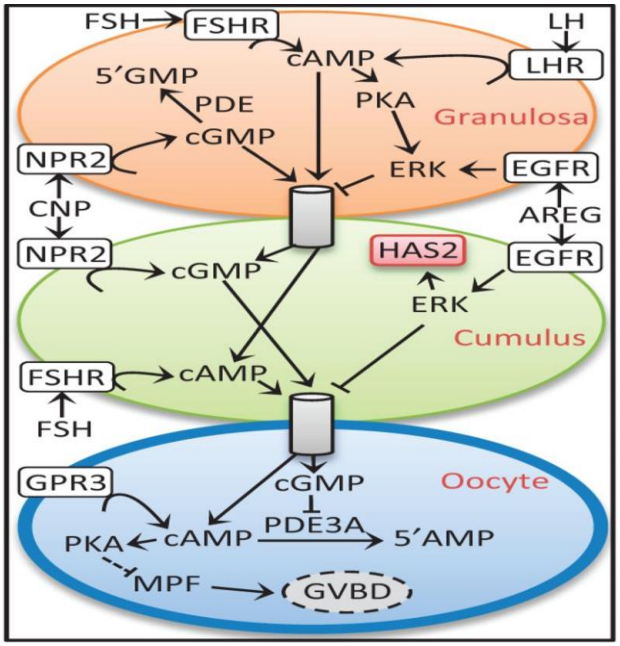
پیک افزایش یا سرژ هورمون لوتئین یا LH (LH ovulatory surge)، به‌طور همزمان به دو اتفاق مهم رقم می‌زند: ۱– افزایش حاد پروتیین عامل رشد اپیدرمیک (EGF) در سلول‌های گرانولوزا که از طریق گپ جانکشن‌ها به کومولوس منتقل می‌شود و موجب آغاز لوتئینه شدن سلول‌های میورال گرانولوزا است (mural granulosa cells). ۲– کاهش

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

شبکه سیگنالینگ مهاری میوتیک وابسته به C-type natriuretic peptide (CNP) and Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) که این دو رخداد در هر دو سلول کومولوس و میورال گرانولوزا به بلوغ اووسیت میورالی می‌انجامد (شکل ۳).[۱۹]

مطالعات دو دهه اخیر نشان می‌دهد که فعالیت گیرنده فاکتور رشد اپیدرمیک (EGFR) برای بلوغ تخمک، گسترش کومولوس و تخمک‌گذاری امر ضروریست، چرا که اثرات القای LH و عوامل رشد به‌وسیله مهار کننده‌های دارویی و اختلال ژنتیکی در شبکه EGF بلوک می‌شوند.[۲۰و۲۱و۲۲]

مطالعات Luna و همکاران نشان داد که قرار گرفتن سیستماتیک موش‌ها در معرض با ایزوپروترنول (آگونیست آدرنرژیک بتا-دو) می‌تواند رشد و متابولیسم آندروژن و همچنین القای یک فنوتیپ تخمدان پلی‌کیستیک را در فولیکولار تخمدانی، تحت تاثیر قرار دهد و این تغییرات را می‌توان توسط پروپرانولول به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده مذکور مهار کرد.[۲۳]



شکل۳: نمایش ارتباطات بین سلولی گرانولوزا، کومولوس و اووسیت در حین فعالیت cGMP/cAMP به‌همراه فعالیت شبکه EGF و هدایت و انتقال سیگنال LH از سلول‌های سوماتیک فولیکول به تخمک جهت از سرگیری مجدد روند میوزیس و تخمک‌گذاری.[۱۹]

قابل ذکر است که مدل تخمدان پلی‌کیستیک در موش صحرایی با رشد شدید اعصاب سمپاتیک تخمدان (Hyperinnervation) همراه است و قطع عصب سوپریور تخمدانی در موش سبب بالا رفتن بیان ژن گیرنده بتا-دو تا در سطح نرمال می‌گردد.[۲۴]

Xia و همکاران در مطالعه گپ جانکشن‌های قلب عملکرد کانکسن (Connexin) ۴۳ را در کنترل گیرنده بتا-دو آدرنرژیک گزارش کردند. بنابراین، اتصال آگونیست گیرنده بتا-دو سبب بالا رفتن فعالیت آدنیل سیکلاز (AC) و افزایش سطح cAMP داخل سلولی می‌شود. بنابراین گیرنده مذکور یک تنظیم‌کننده یا رگولاتور قوی در فعالیت Cx43 و عملکرد گپ جانکشن‌ها در میوسیت‌های قلبی است.[۲۵]

مطالعه ما نیز با این ایده در کمپلکس کومولوس-اووسیت با اتصالات گپ جانکشن طراحی شد. جمع‌بندی این مطالعات و نتایج ما نشان می‌دهد که پاسخ ضعیف تخمدان با فعالیت گیرنده بتا-دو در تعامل معناداری می‌باشند، چرا که در این مطالعه نشان دادیم که بیان ژن دو کانکسن (Connexin) ۴۳ و ۳۷ توسط پروپرانولول افزایش و با ایزوپرترنول مهار و کاهش می‌یابد.

نتایج این مطالعه نشان داد که با کاهش بیان ژن این دو اتصال سلولی دسترسی اووسیت به کلیه مواد غذایی و مهمتر روندهای سیگنالینگ کاهش و یا قطع خواهد شد. بنابراین این یافته می‌تواند یک دیدگاه جدید و ارزشمند در درمان دارویی (پروپرانولول) یا فارماکولوژیک و در فن‌آوری کمک باروری (ART) در زنان با پاسخ تخمدان ضعیف باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. بنابراین درک بهتر مسیرهای سیگنالینگ در طی رشد و بلوغ تخمک می‌تواند تاثیر به‌سزایی در امر راهبردهای مختلف درمان دارویی و همچنین در روند ART داشته باشد. چرا که دسترسی به کیفیت بالای تخمک و سلامت جنین را به‌همراه خواهد داشت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان: بررسی نقش آگونیست و آنتاگونیستی گیرنده بتا-دو آدرنرژیک در بیان ژن گیرنده مذکور در اتصالات سلولی شکافی یا گپ جانکشن (دو کانکسن (Connexin) ۳۷ و ۴۳) سلول کومولوس فولیکول دو گروه بیماران: مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و نابارور پوررسپانس (پاسخ ضعیف) کاندید IVF، مراجعه‌کننده به درمانگاه نازایی بیمارستان ولیعصر (عج) مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران و مقایسه آن با زنان سالم در محیط کشت (In vitro) مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۸

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

دارای کد ۳۲۶۱۲ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه انجام شده است.

References

1. Blumenfeld Z. What Is the Best Regimen for Ovarian Stimulation of Poor Responders in ART/IVF? *Front Endocrinol* 2020;11:192.
2. Polyzos NP, Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril* 2011;96(5):1058 -61.
3. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12(6):685-718.
4. Morley P, Calaresu FR, Armstrong DT. Catecholamines inhibit steroidogenesis by cultured porcine thecal cells. *FEBS Lett* 1990;275(1-2):70–2.
5. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. In vivo beta-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Horm Metab Res* 2012;44:676-81.
6. Santiquet N, Robert C, Richard FJ. The dynamics of connexin expression, degradation and localisation are regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PLoS One* 2013;8(7):e68456.
7. Veitch GI, Gittens JE, Shao Q, Laird DW, Kidder GM. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J Cell Sci* 2004:117: 2699-707.
8. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009;30(5):465-93.
9. Oehninger S, Hinsch E, Pfisterer S, Veeck LL, Kolm P, Schill WB, et al. Use of a specific zona pellucida (ZP) protein 3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function. *Fertil Steril* 1996;65(1):139-45.
10. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62(2):228-32.
11. Richard S, Baltz JM. Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biol Reprod* 2014;90(6):137.
12. Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, et al. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(17):5527-32.
13. Wang Y, Teng Z, Li G, Mu X, Wang Z, Feng L, Niu W, Huang K, Xiang X, Wang C, Zhang H, Xia G. Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development* 2015;142(2):343-51.
14. Salustri A, Petrungaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod* 1985;33(4):797-802.
15. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod* 2009;15(7):399-409.
16. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosophate levels. *Biol Reprod* 2004;70(3):548-56.
17. Appeltant R, Somfai T, Maes D, VAN Soom A, Kikuchi K. Porcine oocyte maturation in vitro: role of cAMP and oocyte-secreted factors - A practical approach. *J Reprod Dev* 2016;62(5):439-449.
18. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012;356(1-2):65-73.
19. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016;152(5):R143-57.
20. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004;303(5658):682-4.
21. Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafriri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 2005;146(1):77-84.
22. Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, et al. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol* 2007;27(5):1914-24.
23. Luna SL, Neuman S, Aguilera J, Brown DI, Lara HE. In vivo β-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Horm Metab Res* 2012;44(9):676-81.
24. Merz C, Saller S, Kunz L, Xu J, Yeoman RR, Ting AY, et al. Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles? *J Ovarian Res* 2015;8:8.
25. Xia Y, Gong KZ, Xu M, Zhang YY, Guo JH, Song Y, Zhang P. Regulation of gap-junction protein connexin 43 by beta-adrenergic receptor stimulation in rat cardiomyocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(7):928-34.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2022; Vol. 79, No. 11: 854-862 Original Article

Evaluation role of beta-2 adrenoceptor agonist and antagonist in the expression of gap junction genes (connexin 37/43) in cumulus cells of women with poor ovarian response

Farideh Zafari Zangeneh Ph.D.[1]*
Samad Muhammadnejad Ph.D.[2]
Mohammad Mehdi Naghizadeh M.Sc.[3]
Maryam Bagheri Ph.D.[1]
Elnaz Hekmat B.Sc.[1]

1- Reproductive Health Research Center, Vali-e-Asr 2 Hospital, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Cell-Based Therapies Research Center, Digestive Disease Research Institute, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Non-Proliferative Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.

*Corresponding author: Reproductive Health Research Center, Vali-e-Asr Hospital, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66581616
E-mail: zangeneh14@gmail.com

Abstract

Received: 06 Aug. 2021 Revised: 13 Aug. 2021 Accepted: 14 Jan. 2022 Available online: 21 Jan. 2022

Background: Connexon is a membrane structural protein in the gap junctions. These cellular connections are responsible for transporting ions and messenger molecules to the oocyte. This study aimed to investigate the role of beta-2-adrenoceptors in the process of follicle growth based on the expression of the two connexins 37/43 in the gap junctions that have a primary role in the mitotic resumption and oocyte maturation.

Methods: This case-control study was conducted from April 2019 to November 2020 at the Reproductive Health Research Center of Tehran Imam Khomeini Hospital was performed on women with the poor ovarian response (POR) and control (women donate eggs) groups. Both groups had entry criteria with a body mass index under 28 m^2/kg and 20-45 years old. Exit criteria were including no drug use except ovarian stimulants and no illness. The diagnosis was made agreeing to the Bologna model criterion. Ovulation stimulation cycle was performed, and then after the puncture, cumulus cells were isolated by enzyme and were freezing in -80 centigrade until the time of inserting into the cell culture medium. Isoproterenol (agonist) and propranolol (antagonist) at a concentration of 100 nM were added to the culture medium as the beta-2 adrenoceptors selective drugs. After culture, RNA extraction was performed and the concentration was read by Nanodrop, and then cDNA was synthesized. Gene expression was determined by real-time PCR.

Results: The findings of connexin expression in the three study groups: without the drug ($P<0.001$), propranolol ($P<0.001$), and isoproterenol ($P<0.001$) were significant compared to the control group. Isoproterenol decreased expression but propranolol increased it ($P<0.001$).

Conclusion: These findings confirm the important role of connexins 37 and 43 in cumulus cleft junctions that propranolol was able to increase its expression. Therefore, we suggest firstly these two connexins can be an effective target for oocyte growth and maturation. Secondly, propranolol could be a new treatment for women with POR and be effective in assisted reproductive technology (ART).

Keywords: adrenoceptor, cumulus cell, gene expression, two connexin 37/43, women with poor ovarian response.

Copyright © 2022 Zafari Zangeneh et al.Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]