نقش گرلین و گیرنده گرلین تخمدان در پاتوژنز سندرم تخمدان پلی‌کیستیک

- **معصومه معتمدی‌جویباری**: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران
- **همایون خزعلی***: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک معمولاً با چاقی همراه است. گرلین نوروپپتیدی است که نقش کلیدی در متابولیسم ایفا می‌کند. در این مطالعه، بیان mRNA گرلین و گیرنده آن، توسط تکنیک real-time PCR در موش‌های صحرایی نرمال و موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیسیتک، جهت تعیین نقش گرلین در پاتوژنز سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

٤٨ موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستار به دو گروه تقسیم شدند. در گروه ۱، حیوانات تحت تزریق دورن عضله‌ای ٠/٤ میلی‌گرم استرادیول والرات، ٦٠ روز قبل از روز آزمایش قرار گرفتند. حیوانات گروه ۲ دست‌نخورده باقی ماندند. در روز آزمایش، حیوانات در هر گروه توسط تست واژینال اسمیر به چهار گروه (پرواستروس، استروس، دی استروس ۱ و دی استروس۲) تقسیم شدند. تخمدان‌ها جدا شده و میزان بیان گرلین و گیرنده گرلین توسط روش real-time PCR اندازه‌گیری شد. بیانmRNA گرلین در موش‌های مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک به‌طور معنی داری در فازهای دی استروس ۱ و ۲ پایین‌تر از موش‌های نرمال بوده اما در فازهای پرواستروس و استروس بالاتر بوده است. اما اختلاف معنی‌داری بین بیان گیرنده گرلین در موش‌های نرمال و مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دیده نشده است.

کلمات کلیدی: تخمدان پلی‌کیستیک، گرلین، گیرنده گرلین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hkhazali@hotmail.com

مقدمه

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOs) مهم‌ترین بیماری اندوکرینی در زنان بوده که حدود ۵ تا ۱۰ درصد زنان در سن باروری را مبتلا می‌سازد (۵،۲۲،۲۳،۳۲). این بیماری با افزایش تولید آندروژن، عدم تخمک‌گذاری و کیست متعدد در دیواره تخمدان همراه بوده که امروزه مهم‌ترین عامل ناباروری در زنان می‌باشد (۳۳،۳۵).

در حقیقت در رابطه با چرایی و عامل اصلی این بیماری، به‌علت پیچیده بودن و تنوع در وضعیت هورمونی این بیماری هنوز نمی‌توان قاطع نظر داد (۱،۶). عامل چاقی در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک شناخته شده نیست اما این بیماری با سندرم‌های متابولیک مانند چاقی و دیابت همراه بوده به‌طوری که شیوع این بیماری در افراد با وزن بالا و دیابت نوع ۲ بیش از ۶۰٪ می‌باشد (۳،۹،۲۷). مطالعات نشان داده که افزایش چاقی به‌ویژه چاقی شکمی با هایپرآندروژمیا و مقاومت به انسولین همراه است. از آن‌جایی که این بیماری در زنان با وزن بالا بسیار شایع بوده و گرلین یکی از هورمون‌های درگیر در چاقی و بالانس انرژی می‌باشد که سطح آن در افراد چاق پایین می‌آید (۲،۷،۲۴،۲۶،۳۶). بنابراین این احتمال به‌وجود می‌آید که کاهش سطح گرلین در طولانی مدت می‌تواند خود به‌عنوان عاملی در ایجاد تخمدان پلی‌کیستیک عمل کند. در حقیقت نشان داده شده که در زنان مبتلا به PCOs میزان گرلین پایه کم‌تر از زنان نرمال است(۱۶،۱۷،۳۰،۱۸،۱۹). رابطه مثبت و بسیار معنی‌داری بین غلظت گرلین و میزان مقاومت انسولین در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک وجود دارد. بنابراین، بیماران مبتلا به این بیماری که مقاومت به انسولین نیز دارند با متفومین درمان می‌شوند. این دارو که حساسیت به انسولین را در این بیماران بهبود می‌بخشد سطح سرمی گرلین را بالا می‌برد (۳۱). گرلین به‌عنوان یک لیگاند اندوژن برای گیرنده هورمون رشد شناخته شده است. عملکرد گرلین از طریق برهمکنش با یک گیرنده جفت شده با G. Protein به‌نام GHS-R انجام می‌شود. دو ایزوفرم mRNA گیرنده گرلین (نوع 1a و 1b) توسط ژن GHS-R کد شده و توسط پردازش‌های مختلف mRN تولید می‌شوند (۲۰). گرلین، جدا از فعالیت ترشحی GH هم‌چنین به‌طور معنی‌داری ترشح پرولاکتین، ACTH و کورتیزول را تحریک می‌کند. تعداد زیادی از اثرات مرکزی و محیطی آن مشخص شده است که شامل: تنظیم اشتها و وزن، متابولیسم کربوهیدرات، عملکرد قلب، محور تولیدمثلی، عملکرد اندوکرین و تقسیم سلولی می‌باشد (۱۰،۱۲). بیان mRNA گرلین و گیرنده آن در بسیاری از بافت‌های انسانی شامل تخمدان گزارش شده است (۲۱). با استفاده از روش ایمونوهسیتوکمیستری، وجود گرلین و گیرنده عملکردی آن در تخمدان انسان گزارش شد (۱۱).

از آن‌جایی‌که مشخص نیست که آیا بیان غیرنرمال گرلین و گیرنده عملکردی آن در تخمدان می‌توانند در پاتوژنز زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نقش داشته باشد. این مطالعه در راستای تعیین نقش گرلین و گیرنده آن در پاتوژنز سندرم تخمدان پلی‌کیستیک انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۸ موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستار (دو گروه و ۴ زیرگروه n=6) با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم در شرایط دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به‌طور جداگانه در قفس‌ها قرار گرفته و نگه‌داری شدند. موش‌های صحرایی در این آزمایش به دو گروه تقسیم شدند. در گروه اول حیوانات تحت تزریق داخل عضلانی ۰/۴ میلی‌گرم استرادیول والرات حل شده در ۲ میلی‌لیتر روغن زیتون برای ابتلا به تخمدان پلی‌کیستیک، ۶۰ روز قبل از انجام آزمایش قرار گرفتند. گروه دوم به‌عنوان گروه شاهد بوده و دست نخورده باقی ماندند.

حیوانات در هر گروه در صبح روز آزمایش به‌منظور بررسی دوره سیکلی تحت آزمایش vaginal smear قرار گرفتند تا به ۴ دسته پرواستروس، استروس، دی‌استروس۱ و دی‌استروس ۲ تقسیم شدند. در ساعت ۸ صبح روز آزمایش رت‌ها توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین و زایلزین بی‌هوش شده و تخمدان آن‌ها به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه جدا شده و به‌سرعت در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای ارزیابی بیان ژن گرلین و گیرنده گرلین از PCR کمی براساس روش سایبرگرین استفاده شد. به این منظور از سه کیت استخراج Total RNA از بافت تخمدان (RNX, Sinagene)، کیت سنتز cDNA، (Vivantis) و کیت real-time PCR (Ampicon) استفاده شد.

RNA کل براساس روش فنل/کلروفرم متناسب با دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص و غلظت نمونه بر توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. برای ساخت cDNA از آنزیم M-muLV Reverse transcriptase (شرکت Vivantis) استفاده شد. برای این کار، ۶ میکروگرم از RNA مطلق مرحله قبل

را با ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo (dT) و ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار مخلوط با آب دیونیزه RNase free به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بلافاصله روی یخ قرار داده شد. سپس به محلول اخیر، ۲ میکرولیتر بافر 10X، ۱۰۰ واحد آنزیم Reverse Transcriptase و ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد. محلول به‌مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده، و برای توقف واکنش دوباره به‌مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. دو جفت پرایمر (شرکت Bioneer-کره جنوبی) برای ارزیابی ژن هدف (گرلین و گیرنده نوع 1a) و یک جفت برای ژن رفرنس (GAPHD) تهیه شد.

برای انجام real- time PCR، از کیت مخصوص واکنش real-time PCR شرکت آمپلیکون استفاده شد. به ازای ۲۵ میکرولیتر حجم واکنش RT-PCR، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای توالی ژن هدف (گرلین و گیرنده گرلین) و ژن رفرنس (GAPHD) با غلظت ۲۰ پیکومول و ۲/۵ میکرولیتر از توالی الگو(cDNA به‌دست آمده از مرحله قبل)به‌میکروپلیت‌های حاوی ۲/۵ میکرولیتر مستر آمپلیکون اضافه و حجم آن با آب RNase free به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط به‌دست آمده ورتکس و سپس اسپین شد و براساس پروفایل دمایی و زمانی در دستگاه real- time PCR قرار داده شد. داده‌های حاصل از دستگاه ترموسایکلر با نرم‌افزار Rest مورد ارزیابی قرار گرفتند. وجود باند واحد اختصاصی و باندهای غیراختصاصی با بررسی منحنی ذوب حاصل از واکنش کمی مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین محصولات به‌دست آمده از PCR در آگاروز ۱/۷٪ الکتروفورز شدند.

تمامی داده‌ها برای مقایسه میانگین بیان ژن گرلین و گیرنده گرلین در گروه‌های نرمال و PCO، با تغذیه نرمال و تحت رژیم غذایی با کمک نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری واریانس دوطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مشاهده معنی‌دار بودن تغییرات از پس آزمون بنفرونی استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان‌شده و مقادیر (P≤۰/۰۵) معنی دار تلقی گردید.

نتایج

وزن تخمدان در موش‌های صحرایی که در آن‌ها به‌واسطه تزریق عضلانی استرادیول والرات، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک القاء شد، پایین‌تر از موش‌های صحرایی نرمال بود در صورتی‌که حجم آن افزایش یافت (P≤۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در real-time PCR

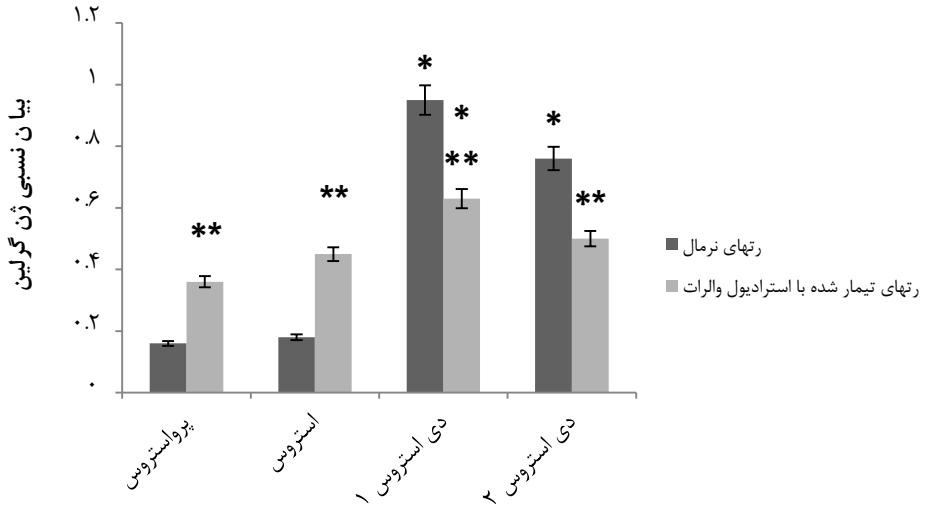
ژن مورد نظر	پرایمر معکوس	پرایمر فوروارد
گرلین	AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT	TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA
گیرنده گرلین نوع 1a	GACAAGGATGACCAGCTTCACG	AGGCAACCTGCTCACTATGCTG
GAPHD	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT	AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT

جدول ۲: اثر تزریق درون عضلانی استرادیول والرات بر میانگین وزن تخمدان در موش صحرایی ماده

	گروه شاهد	گروه PCOs
وزن تخمدان (گرم)	۰/۵۴	۰/۳۵
اندازه تخمدان (میلی‌متر مربع)	۱۶	۲۷

بیان گرلین در تخمدان موش‌های صحرایی نرمال کاملاً وابسته به سیکل بوده به‌طوری‌که میزان mRNA گرلین در فاز پرواستروس در پایین‌ترین حد خود بوده درصورتی‌که میزان آن در فاز دی‌استروس ۱ در بالاترین میزان آن قرار داشته است (P≤۰/۰۵) (شکل ۱).

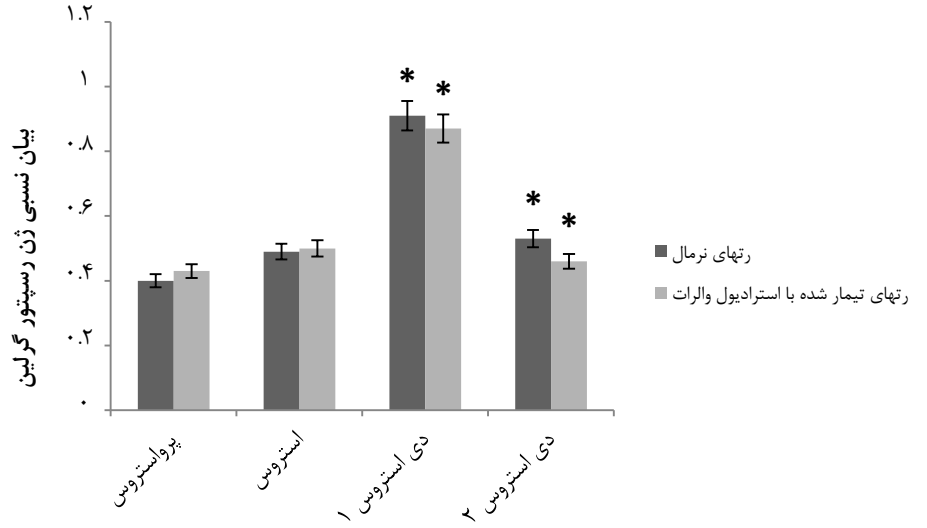
بیان گرلین تخمدان در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با موش‌های صحرایی نرمال در فازهای دی‌استروس ۱ و ۲ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت درحالی‌که در فازهای پرواستروس و استروس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P≤۰/۰۵) (شکل۱).



شکل ۱: میانگین تغییرات بیان نسبی mRNA ژن گرلین در فازهای مختلف سیکل استروس، در موش‌های صحرایی نرمال و موش‌های صحرایی تیمار شده توسط استرادیول والرات

مقادیر به‌صورت Mean±SEM بیان شده‌اند. * اختلاف معنی‌دار بین فازهای مختلف استروس در گروه شاهد و گروه تیمار شده با استرادیول والرات است. ** اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار شده با استرادیول والرات در مقایسه با گروه شاهد است (P≤۰/۰۵).

بیان گیرنده گرلین در تخمدان موش‌های صحرایی نرمال اگرچه در فاز دی‌استروس ۱ به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر فازها است اما بین سایر فازها اختلاف معنی‌دار نیست (شکل ۲). بیان گیرنده گرلین تخمدان در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک اختلاف معنی‌داری با موش‌های صحرایی نرمال ندارد.



شکل ۲: میانگین تغییرات بیان نسبی mRNA ژن گیرنده نوع 1a گرلین در فازهای مختلف سیکل استروس، در موش‌های صحرایی نرمال و موش‌های صحرایی تیمار شده توسط استرادیول والرات

مقادیر به‌صورت Mean±SEM بیان شده‌اند. *اختلاف معنی‌دار بین فازهای مختلف استروس در گروه شاهد و گروه تیمار شده با استرادیول والرات است (P≤۰/۰۵).

بحث

گرلین یک پپتید مشتق از معده بوده که عملکرد اصلی آن روی ترشح هورمون‌های هیپوفیزی و هومئوستازی انرژی است. تزریق طولانی مدت گرلین در مدل‌های حیوانی از طریق تحریک غذا خوردن، تجمع چربی در بدن را افزایش داده و منجر به چاقی می‌شود (۱۳). در انسان‌ها، در شرایط سوء تغذیه مزمن مانند آنورکسیا نرووسا، سطح سرمی گرلین افزیش یافته درحالی‌که چاقی با کاهش سطح گرلین سرمی همراه است که بعداز کاهش‌وزن دوباره گرلین افزایش می‌یابد (۲۵). این داده‌ها از نقش گرلین در پاتوژنز چاقی حمایت می‌کند. زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک معمولاً چاق بوده و هم‌چنین معمولاً با اختلالات متابولیک دیگری مانند مقاومت به انسولین همراه می‌باشند (۳۴). حجم زیادی از داده‌هایی در رابطه با هومئوستازی گرلین در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک وجود دارد. در برخی مطالعات دیده شده است که گرلین گرسنگی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک پایین‌تر از زنان نرمال است. اما این در همه مطالعات تایید نشده است (۱۴،۳۰).

مطالعات زیادی حاکی از نقش گرلین در کنترل جنبه‌های کلیدی عملکردهای تولیدمثلی است(۲۸،۳۱). این مطالعات نشان دادند که بیان مداوم ژن گرلین در تخمدان موش صحرایی در طی مراحل استروس وجود دارد. البته این بیان حالت سیکلی داشته و پایین‌ترین سطح mRNA گرلین در فاز پرواستروس دیده شده درحالی‌که پیک بیان آن در فاز دی‌استروس۱ دیده می‌شود، که در مرحله فاز لوتئال سیکل است(۱۵). این مطالعات همگی پیشنهاد می‌کند که گرلین ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده پاراکرین یا اتوکرین فیزیولوژی تخمدان عمل کند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR، بیان گرلین و گیرنده عملکردی آن در تخمدان موش‌های صحرایی شاهد و موش‌های صحرایی PCO القاء شده توسط تزریق درون عضلانی استرادیول والرات مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از این آزمایش برای اولین بار نشان داد که بیان گرلین تخمدان در موش‌های صحرایی مبتلا به PCOs به‌طور معنی‌داری پایین تر از بیان گرلین در تخمدان موش‌های صحرایی نرمال است. از طرف دیگر، داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که گرلین ترشح سیکلی خود را از دست می‌دهد. یعنی بیان نسبی گرلین در فاز دی‌استروس ۱ و ۲ که بیان گرلین به‌طور نرمال بالاتر است (۴). نسبت به فاز پرواستروس و استروس کاهش می‌یابد. درحالی‌که بیان گرلین در فاز پرواستروس و استروس در موش‌های صحرایی PCO در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌یابد که این نتیجه حاکی از همیت ترشح فازی گرلین برای عملکرد صحیح استروئیدوژنز است.

کاهش و از بین رفتن طرح سیکلیک گرلین می‌تواند یک نکته کلیدی در پاتوژنز سندرم تخمدان پلی‌کیستیک باشد. چرا که مطالعات زیادی حاکی از اثر مهاری گرلین بر عملکرد لوتئال است. به‌طوری‌که تزریق گرلین به‌محیط کشت سلول‌های لوتئال انسان موجب کاهش هم ترشح پروژسترون پایه و هم ترشح پروژسترون تحریک شده توسط HCG می‌شود (۴). اثر مهاری گرلین بر ژن‌های درگیر در مسیر استروئیدوژنز در موش‌های صحرایی نر نیز اثبات شد (۱۲).

بنابراین می‌توان احتمال داد که در حالت نرمال کاهش شدید بیان گرلین در فاز پرواستروس که فاز حداکثر فعالیت ژن آروماتاز است برای فعالیت آن ضروری می‌باشد (۸). به‌طوری‌که با افزایش بیان گرلین در تخمدان، کاهش بیان در آروماتاز اتفاق می‌افتد. به‌طوری‌که در فازهای استروس و دی‌استروس ۱ و ۲ بیان گرلین بالا رفته اما بیان آروماتاز کاهش می‌یابد. اما این طرح سیکلیک در تخمدان موش‌های صحرایی ماده PCOs دیده نمی‌شود.

در مطالعه‌ای که توسط Ishikawa و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد، رابطه بین بیان گرلین در بیضه انسان و سطح سرمی تستسترون مورد بررسی قرار گرفت. دیده شد که میزان گرلین بیضه با ترشح تستسترون رابطه عکس دارد به‌طوری‌که در افرادی که دچار افزایش تستسترون هستند. نسبت سلول‌های دارای گرلین پایین بوده و برعکس در افرادی که غلظت سرمی تستسترون پایین است، تعداد سلول‌های لایدیگ دارای گرلین به کل سلول‌های لایدیگ بالا است. هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که گرلین ترشح تستسترون تحریک شده با cAMP و CG را مهار کرده که این مهار با کاهش سطح mRNA فاکتورهای کلیدی مسیر استروئیدوژنز شامل STAR، 3B-HSD و 17B-HSD نوع ۳ در بیضه همراه است (۱۲،۲۹).

بنابراین همگی این داده‌ها حاکی از نقش مهاری گرلین بر تولید و ترشح تستسترون می‌باشد. در این مطالعه کاهش بیان گرلین در تخمدان موش‌های صحرایی PCOs نیز شاهد دیگری بر نقش گرلین به‌عنوان یک فاکتور کنترل‌کننده ترشح آندروژن می‌باشد. چراکه در موش‌های صحرایی PCOs که میزان آندروژن سرمی بالا است بیان mRNA گرلین پایین است. بنابراین با توجه‌به مطالعه حاضر می‌توان گرلین را یک فاکتور تنظیم‌کننده

موضعی در کنترل فعالیت تخمدانی دانست و از طرف دیگر یک نقش پاتوژنز برای آن در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک قائل شد.

منابع

1. **Arvat, E.; Gianotti, L.; Giordano, R.; Broqlio, F.; Maccario, M. and Lanfranco, F., 2001.** Growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogue-receptor ligands: focus on reproductive system. Endocrinol. Vol. 14, No. 1, pp: 35-43.
2. **Asuncion, M.; Calvo, R.M.; San Millan, J.L.; Sancho, J.; Avila, S. and Escobar-Morreale, H.F., 2000.** A prospective study of the prevalence of the Polycystic Ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrin Metab. Vol. 85, No. 7, pp: 2434-2438.
3. **Barlier, A.; Zamora, A.J.; Grino, M.; Gunz, G.; Pellegrini-Bouiller, I. and Morange-Ramos, I., 1999.** Expression of functional growth hormone secretagogue receptors in human pituitary adenomas: polymerase chain reaction, triple in-situ hybridization and cell culture studies. J Neuroendocrinol. Vol. 11, No. 7, pp: 491-502.
4. **Barreiro, M.; Gaytan, F.; Caminos, J.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F. and Aquilar, E., 2002.** Cellular location and hormonal regulation of ghrelin in rats testis. Biol Reprod. Vol. 67, No. 6, pp: 1768-1776.
5. **Brandt, M.E.; Puett, D. and Zimniski, S.J., 1990.** Divergence between ovarian aromatase activity, estrogen, and androgen levels in the cycling rat. Endocrinol., Vol. 126, No. 1, pp. 72-9.
6. **Caminos, J.E.; Tena-Sempere, M. and Gaytan, F., 2003.** Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. Endocrinol. Vol. 144, No. 4, pp: 1594-1602.
7. **Diamanti-Kandarakis, E.; Kouli, C.R.; Bergiele, A.T.; Filandra, F.A.; Tsianateli, T.C. and Spina, G.G., 1999.** A survey of the Polycystic Ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: Hormonal and metabolic profile. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 84, No. 11, pp: 4006-4011.
8. **Ehrmann, D.; Rosenfield, R.; Barnes, R.B.; Berigell, D.F. and Sheikh, Z., 1992.** Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. N Engl J Med. Vol. 327, pp: 157-162.
9. **Franks, S., 1995.** Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med. Vol. 333, pp: 853-861.
10. **Gambineri, A.; Pagotto, U.; Pelusi, C.; Paqotto, U. and Pasquali, R., 2002.** Obesity and the polycyctic ovary syndrome. Integ J Obes. Vol. 26, No. 7, pp: 883-896.
11. **Gaytan, F.; Barreiro, M.L.; Chopin, L.K.; Herington, A.C.; Morales, C. and Pinilla, L., 2003.** Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 88, No. 2, pp: 879-87.
12. **Gnanapavan, S.; Kola, B.; Bustin, S.A.; Morris, D.G.; McGee, P. and Fairclpigj, P., 2002.** The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 87, No. 6, pp: 2988-91.
13. **Ishikawa, T.; Fujioka, H.; Ishimura, T.; Takenaka, A. and Fujisawa, M., 2007.** Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. J Androl. Vol. 28, No. 2. pp: 320-324.
14. **Kauffinan, R.P.; Baker, V.M.; Dimarino, P.; Gimper, T. and Castracane, V.D., 2002.** Polycystic Ovary syndrome and insulin resistance in white and Mecican American women: a comparison of two distinct populations. America J Obs Gynae. Vol. 187, No. 5, pp: 1362-1369.
15. **Knochenhauer, E.; Key, T.J.; Kahsar-Miller, M.; Waggoner, W.; Boots, L.R. and Azziz, R., 1998.** Prealence of the Polycystic Ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 83, No. 9,pp: 3078-3082.
16. **Lee, H.M.; Wang, G.; Englander, E.W.; Kojima, M. and Greeley, G.H., 2002.** Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietary manipulations. Endocrinol. Vol. 143, No. 1, pp: 185-90.
17. **Martynska, L.; Wokinska-Witort, E.; Chmielowska, M.; Bik, W. and Baranowska, B., 2005.** The Physiological role of orexins. Neuroendocrinol Lett. Vol. 26, No. 3, pp: 289-292.
18. **Mitkov, M.; Pehlivanov, B. and Orbetzova, M., 2008.** Serum ghrelin levels in women with Polycystic Ovary syndrome and its relationship with endocrine and metabolic parameters. Gynecol Endocrinol. Vol. 24, No.

11, pp: 625-630.

19. **Moghetti, P.; Castello, R.; Negri, C.; Tosi, F.; Perrone, F. and Caputo, M., 2000.** Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 85, No. 1, pp: 139-46.
20. **Moran, L.J.; Noakes, M.; Clifton, P.M.; Wittert, G.A.; Le Roux, C.W. and Bloom, S.R., 2007.** Postprandial ghrelin, cholecydtokinin, peptid YY, and appetite before and after weight loss in overweight women with and without polycystic ovary syndrome. A JCN. Vol. 86. No. 6, pp: 1603-1610.
21. **Orio, F.J.; Lucidi, P.; Palomba, S.; Tauchmanova, L.; Cascella, T. and Russo T., 2003.** Circulating ghrelin concentration in the Polycystic Ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 88, No. 2, pp: 942-945.
22. **Otto, B.; Cuntz, U.; Fruehauf, E.; Wawarta, R.; Folwaczny, C. and Riepl, R.L., 2001.** Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. Eur J Endocrinol. Vol. 145, No. 5. pp: 669-73.
23. **Panidis, D.; Farmakiotis, D.; Koliakos, G.; Rousso, D.; Kourtis, A. and Katsikis, I., 2005.** Comparative study of plasma ghrelin levels in women with Polycystic Ovary syndrome, in hyperandrogenic women and in normal and in normal controls. Hum Reprod. Vol. 20, No. 8, pp: 2127-2132.
24. **Pasquali, R. and Casimirri, F., 1993.** The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. Clin Endocrinol. Vol. 39, No. 1, pp: 1-16.
25. **Rosicka, A.; Krsek, M.; Matoulck, M.; Jarkovaska, Z.; Marek, J. and Justova, V., 2003.** Serum ghrelin levels in obese patients: The relationship to serum leptin levels and soluble receptors levels. Physiol Res. Vol. 52, No. 1, pp: 61-66.
26. **Schofi, C.; Horn, R.; Schill, T.; Schlosser, H.W.; Muller, M.J. and Brabant, G., 2002.** Circulating ghrlein in patient with Polycystic Ovary syndrome. J Clin Endocrin Metab. Vol. 87, No. 10, pp: 4607-4610.
27. **Seow, K.M.; Lin, Y.H.; Hwang, J.L.; Wang, P.H.; Ho, L.T. and Lin, Y.H., 2011.** Expression levels of haem oxygenase-1 in the omental adipose tissue and peripheral blood mononuclear cells of women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. Vol. 26, No. 2, pp: 431-437.
28. **Shiiya, T.; Nakazato, M.; Mizuta, M.; Date, Y.; Mondal, M.S. and Tanaka, M., 2002.** Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 87, No. 1, pp: 240-244.
29. **Tena-Sempere, M.; Barreiro, M.L.; Gonzalez, L.C.; Gaytan, F.; Zhang, F.P. and Caminos, J.E., 2002.** Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. Endocrinol. Vol. 143, No. 2, pp: 717-25.
30. **Tropea, A.; Tiberi, F.; Minici, F.; Orlando, M.; Gangale, M.F. and Romani, F., 2007.** Ghrelin affects the release of luteolytic and luteotropic factors in human luteal cells. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 92, No. 8, pp: 3239-3245.
31. **Tschop, M.; Smiley, D.L. and Heiman, M.L., 2000.** Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature. Vol. 407, No. 6806, pp: 908-913.
32. **Tshop, M.; Weyer, C.; Tataranni, P.A.; Devanarayan, V.; Ravussin, E. and Heiman, M.L., 2001.** Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes. Vol. 50, No. 4, pp: 707-709.
33. **Ueno, H.; Yanaguchi, H.; Kanagawa, K. and Nakazati, M., 2005.** Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. Regul Pept. Vol. 126, No. 1-2, pp: 11-19.
34. **Wang, H.; Li, Q.; Wang, T.; Yanq, G.; Wang, Y. and Zhang, X., 2011.** A common polymorphism in the human aromatase gene alters the risk for polycystic ovary syndrome and modifies aromatase activity in vitro. Mole hum Reprod. Vol. 17, No. 6, pp: 386-391.
35. **Williamson, K.; Gunn, A.; Johnson, N. and Milsom, S.R., 2001.** The impact of ethnicity on the presentation of Polycystic Ovary syndrome. Aus Obs Gynae. Vol. 41, No. 2, pp: 202-206.
36. **Wren, A.M.; Small, C.J.; Abbott, C.R.; Dhillo, W.S.; Seal, L.J. and Cohen, M.A., 2001.** Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. Diabetes. Vol. 50, No. 11, pp: 2540-2547.