

Functional and histopathological kidney injury in hyperandrogenic female rats - a polycystic ovary animal model

Nima Forghani¹, Zeinab Karimi^{2*}, Mokhtar Mokhtari¹, Mehrdad Shariati¹, Fatemeh Masjedi²

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

²Shiraz Nephro-Urology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 6 Sep 2021

Accepted: 28 Oct 2021

ePublished: 14 Feb 2022

Keywords:

Polycystic ovary syndrome,
Acute kidney injury,
Dehydroepiandrosterone,
Hyperandrogenism,
Histopathology

Abstract

Background. Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common reproductive disorder in premenopausal women. This syndrome is also associated with many metabolic and cardiovascular complications. These complications are major risk factors for renal injury and kidney disease. Therefore, this study aimed to investigate the types of functional and structural kidney injuries in a hyperandrogenic female rat model.

Methods. Female Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups (n=10 each): control, sham, and dehydroepiandrosterone (DHEA). Plasma total testosterone and kidney functional indices were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and colorimetric techniques. Ovarian and renal histological changes were also evaluated qualitatively and quantitatively by Hematoxylin-Eosin (H&E) staining.

Results. Plasma total testosterone in the DHEA group increased about 9-fold compared to the control and sham groups. There was also a significant increase in Cr, BUN, and absolute excretion of sodium ion. Insignificant increases in glomerular filtration rate (GFR), urine flow rate (V^0), and absolute excretion of potassium ion were observed in DHEA group compared to other groups. However, significant damages were observed in the glomerular and tubular parts of the kidneys and the follicular parts of the ovaries in DHEA-receiving rats.

Conclusion. Hyperandrogenemia is likely to cause systemic abnormalities through a variety of mechanisms, followed by obvious destruction of kidney and ovarian tissues. Accordingly, DHEA administration provides a useful animal model for studying the mechanism of PCOS-mediated renal injury.

Practical Implications. The present study Findings can be helpful in identifying the mechanism of PCOS-induced renal injury, especially in younger women.

How to cite this article: Forghani N, Karimi Z, Mokhtari M, Shariati M, Masjedi F. Functional and histopathological kidney injury in hyperandrogenic female rats - a polycystic ovary animal model. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;44(1):26-35. doi: 10.34172/mj.2022.011. Persian.

Extended Abstract

Background

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common reproductive disorder in premenopausal women. PCOS dramatically affects reproductive capabilities and often results in infertility in women. It

is manifested by oligomenorrhea or amenorrhea, oligoovulation or anovulation, and excessive secretion of testosterone. PCOS is characterized by abnormal ovarian function and infertility. However, PCOS is also a type of metabolic dysfunction with a systemic

*Corresponding author; Email: zkarimi@sums.ac.ir

disorder. Many reports show that PCOS is linked to obesity, diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases. These complications are significant risk factors for kidney disease. Notably, they are also common concomitant complications in PCOS, suggesting the high correlation between PCOS and kidney injury. Therefore, this study aimed to investigate functional and structural kidney injuries in a hyperandrogenic female rat model.

Methods

In this study, a total of 30 Sprague–Dawley female rats (200-220 g) were purchased from the Animal Center of Shiraz University of Medical Sciences in Iran. All rats were randomly divided into three groups (n=10 each): control, did not receive any treatment for 28 days; sham (sesame oil vehicle group), received subcutaneously 0.2 mL sesame oil for 28 days; and Dehydroepiandrosterone (DHEA) group (PCOS group), rats were subcutaneously injected with 6 mg DHEA per 100 g day⁻¹ (DHEA dissolved in 0.2 mL sesame oil) for 28 consecutive days to induce hyperandrogenism. Plasma total testosterone assay was carried out using the commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The plasma creatinine (Cr) levels were measured based on Jaffe's enzymatic-colorimetric method, and the assessment of blood urea nitrogen (BUN) was performed based on the urease-glutamate dehydrogenase (GLDH) method. Glomerular filtration rate (GFR), urine flow rate, and absolute excretion of sodium and potassium were calculated using standard formula. Formalin-fixed hemisected kidneys and ovaries were embedded in paraffin, and 5- μ m thick serial sections were prepared and stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) method. Ten randomly selected non-overlapping fields were assessed by a light microscope in each renal slide, and the degree of glomerular and tubular morphological changes was evaluated. The ovary tissue sections were observed under an optical microscope, and different follicular groups were evaluated. To assess changes in ovarian tissue, ovarian structures were categorized into five groups based on morphology: primary follicles (PF), secondary follicles (SF), tertiary (Graafian) follicles (TF), cystic follicles (CF), and corpus luteum (CL); then, their changes in the ovaries were examined.

Results

Plasma total testosterone in the DHEA group increased about 9-fold compared to the control and sham groups. There was also a significant increase in Cr, BUN, and absolute excretion of sodium ions. Insignificant increases in GFR, urine flow rate (V^0), and absolute potassium ions excretion were observed in the DHEA group compared to other groups. By analyzing the histological morphology of ovaries in the control and sham groups, different follicles were seen, including tertiary (Graafian) follicles with a thick layer of granulosa cells and corpus luteum. Several cystic follicles with a very thin layer of granulosa, which is a property of cystic follicles, were seen in the ovaries of the DHEA group. In this group, only a few corpora lutea that indicates ovulation was observed. Therefore, based on the observations of ovarian tissue, DHEA administration to female rats for 28 days created cystic follicles, decreased the number of tertiary follicles and corpus luteum, and significantly reduced ovulation (due to the reduction in the number of corpora lutea). In the control and sham groups, the renal tissue had a completely normal appearance in the cortex and medulla regions. Subcutaneous injection of DHEA for 28 days caused severe structural damage in the female rats' kidneys; the brush border of the proximal tubules was completely shed, the proximal tubules appeared hollow, and necrotic areas were somewhat visible. In addition, proximal tubular epithelial cells were excised in the renal medulla, and casts appeared inside the tubules.

Conclusion

PCOS is the most common reproductive dysfunction in young women. With increases in androgens, PCOS predisposes women to increased risk of renal injury when they are young, as well as after menopause. In this study, we characterized the renal consequences of hyperandrogenemia in a female rat model that mimics many changes in women with PCOS. The DHEA-administered female rats exhibited increases in Cr and BUN. Moreover, the ovary and kidney showed many abnormal histomorphological signs in this PCOS model. Hyperandrogenemia causes systemic abnormalities, followed by apparent damage to kidney tissue. The use of this model can help to clarify the possible mechanisms by which androgens cause renal disease in women with PCOS.

آسیب‌های عملکردی و هیستوپاتولوژیکی کلیه در موش‌های صحرایی ماده هایپرآندروژن - یک مدل حیوانی تخمدان پلی کیستیک

نیما فرقانی^۱، زینب کریمی^{۲*}، مختار مختاری^۱، مهرداد شریعتی^۱، فاطمه مسجدی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
^۲مرکز تحقیقات بیماری‌های کلیوی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵
پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۶
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

کلیدواژه‌ها:

سندرم تخمدان پلی کیستیک،
آسیب حاد کلیوی، دهیدرواپی-
آندروسترون، هایپرآندروژنیسم،
هیستوپاتولوژی

چکیده

زمینه. سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، شایع‌ترین اختلال تولیدمثل در زنان قبل از یائسگی است. این سندرم همچنین با عوارض متابولیکی و قلبی-عروقی بسیاری همراه است. این عوارض عامل اصلی خطرآفرین برای آسیب‌ها و بیماری‌های کلیوی هستند. بنابراین، این مطالعه برای روشن کردن انواع آسیب‌های عملکردی و ساختاری کلیوی ناشی از القای مدل هایپرآندروژن در موش‌های صحرایی ماده طراحی شد.

روش کار. موش‌های صحرایی ماده نژاد اسپراگ-داولی به طور تصادفی به سه گروه (n= ۱۰) تقسیم شدند: کنترل، شاهد و دهیدرواپی آندروسترون (DHEA). تستوسترون تام پلاسما و شاخص‌های عملکردی کلیه با استفاده از تکنیک‌های الیزا و رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شدند. تغییرات بافت‌شناسی تخمدان و کلیه نیز از لحاظ کیفی و کمی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (H & E) بررسی شدند.

یافته‌ها. تستوسترون تام پلاسما در گروه DHEA در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد تقریباً ۹ برابر افزایش یافت. همچنین افزایش معنی‌دار CT، BUN و دفع مطلق سدیم مشاهده شد. مقادیری افزایش در میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، جریان ادرار (V⁰) و دفع مطلق پتاسیم در گروه DHEA در مقایسه با سایر گروه‌ها دیده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند. آسیب‌های قابل توجهی در قسمت‌های گلومرولی و توبولی کلیه‌ها و بخش‌های فولیکولی تخمدان‌ها در موش‌های دریافت‌کننده DHEA مشاهده شد.

نتیجه‌گیری. احتمالاً هایپرآندروژنیسم باعث ایجاد ناهنجاری‌های سیستمیک از طریق مکانیسم‌های متعدد می‌شود و به دنبال آن تخریب آشکار بافت‌های کلیه و تخمدان روی می‌دهد. بر این اساس، تزریق DHEA یک مدل حیوانی مفید برای مطالعه مکانیسم آسیب‌های کلیوی ناشی از PCOS فراهم می‌کند.

پیامدهای عملی. یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند در جهت شناسایی مکانیسم آسیب‌های کلیوی ناشی از PCOS به ویژه در زنان جوانتر راهگشا باشد.

مقدمه

کیستیک با ابعاد بین ۲ تا ۹ میلی‌متر و همچنین افزایش حجم تخمدان در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک مشخص می‌شوند.^۱ مطالعات بالینی نشان داده است که زنان مبتلا به PCOS، رهایش ضربان‌دار بالاتری از هورمون آزادکننده‌ی گنادوتروپین (GnRH) دارند که منجر به ترشح بیش از حد هورمون لوتئینی (LH) می‌شود. این موضوع باعث بیان زود هنگام گیرنده LH و ایجاد فولیکول‌های در حال رشد در مراحل بسیار ابتدایی تکوین، افزایش تولید آندروژن در سطح تخمدان و در نهایت توقف رشد فولیکول در مرحله آنترال می‌شود.^{۲،۳}

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است که ۹ تا ۱۸ درصد از زنان در سن باروری را با تکیه بر معیارهای تشخیصی تحت تاثیر قرار می‌دهد.^۱ حداقل دو مورد از سه معیار زیر PCOS را تعریف می‌کند: افزایش آندروژن‌ها به صورت بالینی یا بیوشیمیایی، بی‌نظمی قاعدگی و سونوگرافی تخمدان‌های پلی کیستیک.^۲ از نظر بالینی، این علائم با کاهش باروری به دلیل تکوین فولیکولی ناکارآمد و عدم تخمک‌گذاری متعاقب آن ارتباط دارد.^۳ هر دو رویداد عدم تخمک‌گذاری مزمن و افزایش آندروژن‌ها با اختلال رشد فولیکول مرتبط هستند که توسط تعداد زیادی فولیکول

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: zkarimi@sums.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

آزادانه به غذا و آب داشتند. حیوانات به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند (n=10): ۱. گروه کنترل که به مدت ۲۸ روز بدون هیچ تیماری نگهداری شدند. ۲. گروه شاهد (Sham) (گروه دریافت کننده حلال روغن کنجد) که ۲۰۰ میکرولیتر روغن کنجد را به مدت ۲۸ روز به صورت تزریق زیرجلدی دریافت کردند. ۳. گروه دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) (گروه PCOS) که مقدار ۶ میلی گرم DHEA را به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (حل شده در ۲۰۰ میکرولیتر روغن کنجد) روزانه به مدت ۲۸ روز متوالی به صورت تزریق زیرجلدی برای ایجاد مدل بیماری دریافت کردند.^{۱۰} در پایان آزمایش، حیوانات با کتامین و زایلازین (به ترتیب ۵۰ و ۱۰ میلی گرم بر گرم وزن حیوان) بیهوش شدند. سپس نمونه خون از ورید دمی حیوانات گرفته شد. پس از سانتریفیوژ، پلاسما برای ارزیابی تستوسترون تام و شاخص‌های عملکردی کلیه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. پس از آن، حیوانات کشته شدند و تخمدان و کلیه بلافاصله برداشته و در فرمالین ۱۰ درصد برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و ارزیابی پاتولوژیک نگهداری شد.

سنجش تستوسترون تام پلاسما با استفاده از کیت الیزا (شرکت دیامترا ایتالیا) و بر اساس دستورالعمل کیت و به کمک دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر با رسم منحنی استاندارد انجام شد.

سطح کراتینین (Cr) پلاسما، براساس روش آنزیمی-رنگ-سنجی ژافه، توسط کیت تجاری در دسترس (شرکت پارس-آزمون، تهران، ایران) با دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اوره خون (BUN) نیز بر اساس روش اوره‌آز-گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) با کیت تجاری در دسترس (شرکت پارس-آزمون، تهران، ایران) و دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۳۴۰ نانومتر ارزیابی شد. به طور خلاصه، در این روش اوره به محض واکنش با اوره‌آز، آمونیاک و دی‌اکسیدکربن آزاد می‌کند. آمونیاک تولید شده توسط GLDH در حضور ۲-آگزوگلوکوتارات (α -KG) مصرف شده و گلوتامات تولید می‌شود. طی این واکنش، به طور همزمان، NADH به NAD^+ تبدیل می‌شود که منجر به کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌گردد. میزان کاهش جذب در واحد زمان (دقیقه) نشان‌دهنده سطح اوره نمونه است. غلظت‌های سدیم و پتاسیم توسط دستگاه فلیم فوتومتر (Hycel phf 104 -فرانسه) اندازه‌گیری شدند. همچنین با استفاده از فرمول‌های استاندارد، کلیرانس کراتینین به‌عنوان شاخص میزان فیلتراسیون گومرولی (GFR)، میزان جریان ادرار

درست است که PCOS با عملکرد غیرطبیعی تخمدان و ناباروری مشخص می‌شود، اما این سندرم نوعی اختلال عملکرد متابولیک همراه با اختلال سیستمیک نیز است. گزارشات زیادی نشان می‌دهد PCOS ارتباط تنگاتنگی با پیشرفت بیماری چاقی، دیابت، فشار خون بالا، اضطراب، افسردگی، آپنه انسدادی حین خواب، سرطان آندومتر، کبد چرب و بیماری‌های قلبی‌عروقی دارد.^{۹-۷} از طرف دیگر، این ناهنجاری‌های متابولیکی ممکن است خطر عوارض بارداری مانند دیابت بارداری، فشار خون ناشی از بارداری و پره‌اکلامپسی را افزایش دهند،^{۱۱} که نشان‌دهنده ارتباط متقابل بین PCOS و اختلالات متابولیک است.

بیماری مزمن کلیوی (CKD) به صورت از دست دادن تدریجی عملکرد کلیه‌ها طی ماه‌ها تا سال‌ها تعریف می‌شود. بدون پیشگیری و درمان اولیه، CKD می‌تواند در نهایت به حالت‌های بیماری اورمی تا بیماری نهایی نقص کلیوی با افزایش مرگ‌ومیر پیشرفت کند.^{۱۱} با این حال، به دلیل فقدان روش‌های تشخیصی اولیه، بیماران مبتلا به CKD در مراحل اولیه بیماری به ناگزیر نادیده گرفته می‌شوند. بیماری CKD با ناهنجاری‌های متابولیک مانند چاقی، دیابت و بیماری‌های قلبی‌عروقی تا حد زیادی مرتبط است.^{۱۲} نکته قابل توجه اینجاست که همه این ناهنجاری‌ها از عوارض شایع رایج در PCOS هستند که نشان‌دهنده ارتباط بالای بین PCOS و احتمال آسیب کلیوی است. مطالعات گذشته تا حدودی رابطه احتمالی بین PCOS و بیماری‌های کلیوی را نشان داده‌اند. بیش از ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به PCOS دارای آلبومینوری اولیه (نسبت آلبومین/کراتینین بالای ۷ میلی‌گرم بر گرم) هستند و با سندرم متابولیک مرتبط هستند.^{۱۳} در مدل‌های حیوانی PCOS، خطر بالای آسیب مزمن کلیوی مرتبط با افزایش سن نشان داده شده است.^{۱۴} با این حال، دانش ما در مورد عوارض و آسیب‌های کلیوی ناشی از PCOS محدود است. بنابراین، این مطالعه برای بررسی این موضوع که آیا هاپیرآندروژنمی منجر به آسیب کلیوی و اختلال عملکردی و بافتی در مدل حیوانی تخمدان پلی‌کیستیک می‌شود یا خیر، طراحی شده است.

روش کار

در این مطالعه، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگ-داولی (در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم) خریداری شده از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز استفاده شدند. تمام حیوانات در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تحت چرخه روشنایی/تاریکی (۱۲:۱۲ ساعت) نگهداری شدند و دسترسی

طبیعی داده‌ها، از آزمون‌های معادل غیرمتغیری استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. تفاوت‌های بین گروه‌های آزمایشی در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با بسته نرم‌افزاری GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد.

یافته‌ها

برای تایید مدل حیوانی هیپراندروزن، سطح تستوسترون تام پلاسما در پایان آزمایش اندازه‌گیری شد. در موش‌های صحرایی ماده هیپراندروزنیک (گروه DHEA)، تستوسترون تام پلاسما در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد تقریباً ۹/۷ برابر افزایش یافته بود ($3/174 \pm 1/352$ در مقابل $0/326 \pm 0/060$).

القای هایپراندروزنیسم با تزریق دهیدرواپی‌آندروسترون در پایان ۲۸ روز دوره آزمایش، باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0/0001$) میزان اوره و کراتینین پلاسما در گروه DHEA در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد شد (جدول ۱).

القای هایپراندروزنیسم با تزریق دهیدرواپی‌آندروسترون در پایان ۲۸ روز دوره آزمایش، باعث افزایش میزان جریان ادرار (V^0) و فیلتراسیون گلومرولی (GFR) در گروه DHEA در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد گردید، اما این مقادیر افزایش یافته از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

القای هایپراندروزنیسم با تزریق دهیدرواپی‌آندروسترون در پایان ۲۸ روز دوره آزمایش، باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0/05$) در دفع مطلق یون سدیم شد، در حالی که تغییر معنی‌داری در دفع مطلق یون پتاسیم ایجاد نکرد (جدول ۱).

و مقادیر دفع مطلق سدیم و پتاسیم محاسبه شدند. کلیه‌ها و تخمدان‌های تثبیت شده با فرمالین در پارافین قالب‌گیری شده و مقاطع سریالی با ضخامت ۵ میکرومتر از آنها تهیه و طبق پروتکل‌های استاندارد با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ-آمیزی شدند. در هر برش کلیوی، تعداد ۱۰ فیلد غیرهمپوشان به طور تصادفی انتخاب شده و با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر توسط میکروسکوپ نوری، میزان تغییرات مورفولوژیکی گلومرولی و توبولی بررسی شد. شاخص‌های بررسی شده شامل ریزش لبه برسی توبول پروگزیمال، نکروز حاد توبولی و کست‌های درون-توبولی بودند. همچنین این شاخص‌ها از لحاظ کمی نیز سنجیده و رتبه‌بندی شدند. مقاطع بافت تخمدان نیز در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر با توجه به گروه‌های مختلف فولیکولی بررسی شدند. برای ارزیابی ریخت‌شناسی، تعداد فولیکول‌های تخمدان و اجسام زرد (CL) در هر بخش تخمدان بررسی شد. فولیکول‌های اولیه با وجود یک یا چند لایه سلولی گرانولوزا در اطراف یک تخمک اولیه شناسایی شدند، فولیکول‌های ثانویه بر اساس وجود یک آنتروم مشخص شدند و فولیکول‌های بالغ بر اساس تکمیل تکوین آنتروم و ارتباط تخمک اولیه با کومولوس اووفوروس ارزیابی شدند. فولیکول‌های بزرگ پر از مایع که با یک لایه سلولی گرانولوزای تحلیل رفته و یک لایه تکا ضخیم شده احاطه شده‌اند، به عنوان فولیکول‌های کیستیک در نظر گرفته شدند. طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. در صورت طبیعی بودن توزیع داده‌ها، مقایسه بین گروه‌ها با آنووا یک طرفه و پس‌آزمون توکی انجام گرفت و در صورت عدم توزیع

جدول ۱. تغییرات میزان اوره و کراتینین پلاسما، عوامل مرتبط با عملکرد کلیه (میزان فیلتراسیون گلومرولی و جریان ادرار) و دفع مطلق سدیم و پتاسیم در گروه‌های آزمایشی

گروه‌های آزمایشی	گروه کنترل	گروه شاهد	گروه DHEA	متغیر بررسی شده
	۰/۵۹۹±۰/۰۸۹	۰/۶۲۲±۰/۰۵۳	۱/۱۶۴±۰/۱۲۲***###	غلظت پلاسمایی کراتینین (mg/dL)
	۹/۳۸۸±۲/۳۴۸	۹/۵۷۷±۲/۲۵۱	۱۸/۵۰۰±۴/۲۳۹***###	غلظت پلاسمایی اوره (BUN) (mg/dL)
	۲۳/۱۸۰±۷/۶۷۳	۱۸/۳۵۰±۴/۴۴۶	۲۴/۲۶۰±۱۰/۵۰۰	میزان جریان ادرار (V^0) (mL/min. kg BW)
	۰/۳۵۰±۰/۱۴۳	۰/۱۹۸±۰/۰۹۲	۰/۴۶۷±۰/۲۲۱	میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) (mL/min. kg BW)
	۶۳۱۲±۲۲۸۳	۸۳۴۶±۲۶۷۸	۱۱۸۵۳±۴۸۸۵*	دفع مطلق سدیم ($\mu\text{mol/min. kg BW}$)
	۲۸۶۰±۱۲۴۱	۳۱۳۲±۱۳۶۶	۳۲۰۷±۱۴۲۱	دفع مطلق پتاسیم ($\mu\text{mol/min. kg BW}$)

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند.

* $P < 0/05$ ، ** $P < 0/001$ و *** $P < 0/0001$ بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

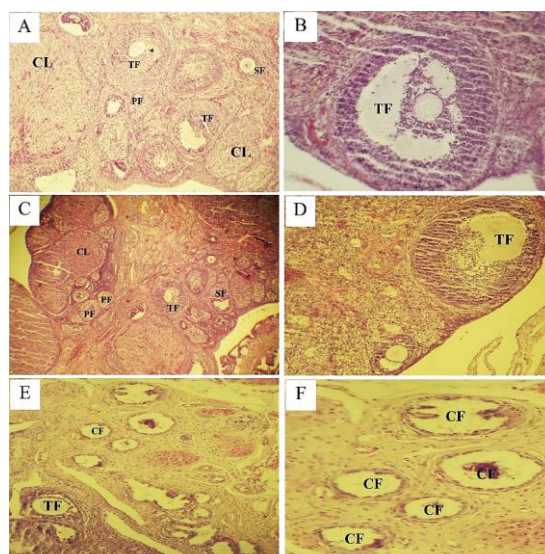
و ### $P < 0/001$ و #### $P < 0/0001$ بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد

جدول ۲. اثرات تزریق داروی DHEA (۶ mg/۱۰۰ g B.W. day⁻¹ S.Q.) برای مدت ۲۸ روز بر شاخص‌های کمی آسیب هیستوپاتولوژیکی کلیه

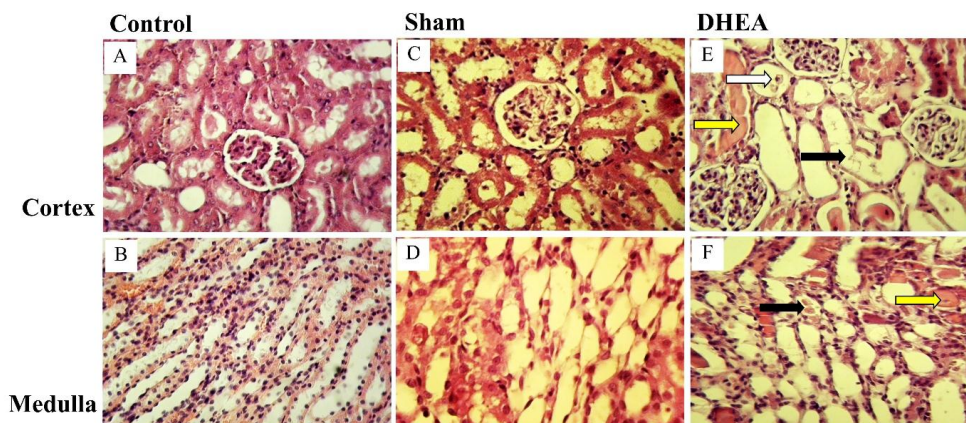
گروه DHEA	گروه شاهد	گروه کنترل	گروه‌های آزمایشی متغیر بررسی شده
۴/۱±۰/۰۹۴***	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	ریزش لبه برسی توبول‌های پروگزیمال
۲/۱±۰/۳۴۷***	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	نکروز حاد توبولی
۲/۳±۰/۱۲۶***	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	کست‌های داخل توبولی
۸/۵±۰/۵۶۹***	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	مجموع نمرات آسیب هیستوپاتولوژیکی کلیه

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

***P<۰/۰۰۱ بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد



شکل ۱. فوتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی H & E از بافت تخمدان گروه‌های آزمایشی. بافت تخمدان همراه با انواع فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین و اجسام لوتئال واضح در گروه‌های کنترل و شاهد که ظاهری کاملاً طبیعی داشتند (قسمت‌های A و C)، بزرگنمایی بالاتر از یک فولیکول بالغ یا گراف در گروه‌های کنترل و شاهد (قسمت‌های B و D). نمایی از تخمدان در موش‌های گروه DHEA (۶ mg/۱۰۰ g B.W. day⁻¹ S.Q.) که فولیکول‌های کیستی حجم زیادی از تخمدان را اشغال کرده‌اند و جمعیت مشخصی از سایر فولیکول‌ها و جسم لوتئال قابل مشاهده نیست (قسمت‌های E و F). [بزرگنمایی قسمت‌های A، C، E و $\times 100 = E$ و $\times 400 = F$ ، فولیکول بدوی یا اولیه، SF: فولیکول ثانویه، TF: فولیکول بالغ یا گراف، CF: فولیکول کیستی، CL: جسم لوتئال.



شکل ۲. فوتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی H & E از بافت کلیه گروه‌های آزمایشی. بافت کلیه در نواحی کورتکس و مدولا، در گروه‌های کنترل و شاهد ظاهری کاملاً طبیعی داشتند (قسمت‌های A، B، C و D). در بافت کلیه‌ی موش‌های گروه DHEA (۶ mg/۱۰۰ g B.W. day⁻¹ S.Q.)، ریزش لبه برسی سلول‌های اپیتلیال توبول‌های پروگزیمال (فلش مشکی) و ایجاد نکروز (فلش سفید) در کورتکس (قسمت E) و کست (فلش زرد) در مدولا (قسمت F) مشخص بود [بزرگنمایی $\times 400$].

دارد، محققان تمایل دارند از مدل‌های حیوانی PCOS در مطالعات خود استفاده کنند. اگرچه هنوز هیچ مدل حیوانی که ویژگی‌های کاملاً مشابهی را با زنان مبتلا به PCOS نشان دهد یافت نشده است، اما نشان داده شده است که این مدل‌ها در ایجاد مطالعات پیش‌بالینی در بررسی علل و علائم PCOS و در ارزیابی اختلالات هورمونی و عملکرد تخمدان مفید هستند.^{۱۶} مدل‌های هورمونی مانند DHEA، دی‌هیدروتستوسترون (DHT)، استرادیول والرات (EV) و لتروزول به طور گسترده‌ای در تحقیقات مرتبط با PCOS استفاده می‌شوند.^{۱۷} بر اساس یافته‌های چندین مطالعه، مدل‌های حیوانی PCOS تولید شده با استفاده از DHEA می‌توانند علائم زیادی از PCOS انسانی را نشان دهند. در عین حال، نتایج مطالعات نشان داده است که PCOS ناشی از DHEA با شروع اولیه (تقریباً ۱۵ سال) PCOS انسانی سازگاری دارد.^{۱۵،۱۸} در مطالعه‌ای روی مدل موشی ایجاد شده توسط DHEA گزارش شده است که قشر تخمدان دارای تعداد افزایش‌یافته فولیکول‌های در حال آترزی است و تعداد زیادی از فولیکول‌های کیستیک با اندازه‌های مختلف که توسط یک لایه نازک از سلول‌های گرانولوزا احاطه شده‌اند، مشخص هستند.^{۱۹} در مطالعه ما نیز مشاهده شد که فولیکول‌های کیستیک مطابق با افزایش سطح تستوسترون در گروه DHEA در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد افزایش یافته‌اند که نشانگر ایجاد صحیح مدل هایپراآندروژن است. هدف اصلی مطالعه حاضر تعیین این بود که آیا موش‌های صحرایی ماده هایپراآندروژن، اثرات منفی کلیوی ناشی از DHEA دارند یا خیر. در مطالعات قبلی روی موش‌های تیمار شده با DHT، GFR در مقایسه با گروه کنترل بدون آسیب گلوبولی یا توبولی که بتواند توسط بررسی مورفولوژیکی تعیین شود، تا حدودی افزایش یافت.^{۲۰} همچنین در مطالعه دیگری روی مدل موش صحرایی یا سسه هایپراآندروژن (PMHAF)، افزایش پروتئینوری و دفع بالای مولکول آسیب‌کلیوی (KIM-1) نشان داد که این حیوانات آسیب کلیوی قابل توجهی داشته و بنابراین در مقایسه با موش‌های کنترل، کاهش GFR را نشان دادند. پروتئینوری در موش‌های PMHAF همچنین ممکن است به دلیل افزایش فشار خون همراه با آسیب گلوبولی باشد.^{۲۱} با این حال، افزایش KIM-1 نشان‌دهنده آسیب توبول پروگزیمال نیز هست.^{۲۲} در توافق با نتایج ما، بانس و همکاران دریافتند که تجویز طولانی‌مدت DHT باعث افزایش جزئی در GFR می‌شود.^{۲۰} این امکان وجود دارد که افزایش گلوکز در گردش خون در موش‌های ماده هایپراآندروژنیک باعث اندکی افزایش در GFR شده باشد.^{۲۳}

فولیکول‌های تخمدان در مراحل مختلف تکوین (اولیه، ثانویه، بالغ) و بعد از تخمک‌گذاری و تبدیل به جسم لوتئال (جسم زرد) در استرومای تخمدان در گروه‌های کنترل و شاهد به خوبی قابل مشاهده بودند (شکل ۱، قسمت‌های A، B، C و D). تزریق داخل صفاقی داروی دهیدرواپی‌آندروسترون برای مدت ۲۸ روز باعث ایجاد مدل هایپراآندروژن و حالت پلی‌کیستیک در تخمدان گردید طوری که بیشتر فضای تخمدان را فولیکول‌های کیستی اشغال کرده‌اند که دارای یک لایه منفرد از سلول‌های گرانولوزای فولیکولی در اطراف خود هستند. سایر فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین و اجسام لوتئال در تخمدان پلی‌کیستیک یا وجود نداشتند یا به سختی قابل تشخیص بودند (شکل ۱، قسمت‌های E و F). تغییرات هیستوپاتولوژیکی کلیه در موش‌های کنترل، شاهد و DHEA در شکل ۲ نشان داده شده است. بافت کلیه در نواحی کورتکس و مدولا، در گروه‌های کنترل و شاهد ظاهری کاملاً طبیعی داشتند (شکل ۲، قسمت‌های A، B، C و D). تزریق داخل صفاقی داروی دهیدرواپی‌آندروسترون برای مدت ۲۸ روز باعث آسیب ساختاری شدیدی در بافت کلیه موش‌ها گردید. طوری که لبه برسی توبول‌های پروگزیمال کاملاً ریزش داشته و توبول‌های پروگزیمال به صورت توخالی ظاهر شده‌اند و در قسمت‌هایی نکروز نیز قابل مشاهده است (شکل ۲، قسمت E). همچنین در قسمت مدولای کلیه نیز، سلول‌های اپی‌تلیال توبول پروگزیمال کنده شده و در داخل توبول‌ها کست ظاهر شده است (شکل ۲، قسمت F). بررسی هیستولوژیکی بافت کلیه از لحاظ کمی و نمره‌دهی به میزان آسیب‌های وارده به بخش‌های کورتکس و مدولا در اثر تزریق داخل صفاقی داروی دهیدرواپی‌آندروسترون برای مدت ۲۸ روز نیز انجام گرفت و نتایج حاصل در جدول ۲ قابل مشاهده است. مصرف داروی دهیدرواپی‌آندروسترون و القای مدل حیوانی PCOS، باعث آسیب‌های جدی و شدید ($P < 0/001$) در بخش‌های عملکردی کلیه (نفرون‌ها) شده است.

بحث

در مطالعه حاضر، ما برخی از پیامدهای کلیوی ناشی از افزایش آندروژن‌ها را در مدل حیوانی هایپراآندروژن مشخص کردیم. یافته‌های اصلی مطالعه از این قرار بود که افزایش تستوسترون تام تا ۹/۷ برابر - سطحی که با سطوح آندروژن در زنان مبتلا به PCOS مطابقت دارد - باعث آسیب مشخص ساختاری و نقص عملکردی کلیوی می‌شود. به دلیل محدودیت‌های اخلاقی و تکنیکی که در مطالعات انسانی وجود

تستوسترون سرم و نشانگرهای پروتئینوری توبولی مانند زنجیره سبک کاپا (KapU)، زنجیره سبک گاما (LamU)، میکروگلوبولین آلفا-1 ($\alpha 1$ -MU) و بتا-2 ($\beta 2$ -MU) اداری ارتباط مثبت وجود دارد.^{۲۸} این موضوع نقش تستوسترون را در بیماری‌زایی آسیب کلیه مرتبط با PCOS، به ویژه آسیب سلول‌های توبولی تایید می‌کند. همچنین، استفاده از مایع فولیکولی از زنان مبتلا به PCOS که سطوح بالاتری از آندروژن‌ها را دارند، در محیط کشت یک رده سلولی اپیتلیال توبولی انسانی (HKC-8) موجب ضایعات فیبروزی در این سلول‌ها شد که شاخص مهمی از آسیب توبولی است.^{۲۸،۲۹} این یافته در تطابق با سایر مطالعاتی است که گزارش داده‌اند تستوسترون می‌تواند باعث آپوپتوز در سلول‌های توبولوژنیک کلیه شود.^{۳۰} بر اساس این شواهد، یکی از دلایل عمده آسیب توبولی در مدل PCOS در مطالعه حاضر نیز می‌تواند به دلیل افزایش سطح آندروژن‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

PCOS شایع‌ترین اختلال باروری در زنان جوان است. این سندرم با افزایش آندروژن‌ها، زنان را در معرض خطر افزایش آسیب کلیه در جوانی و پس از آن در یائسگی قرار می‌دهد. ما پیامدهای کلیوی هایپراندرژنمی را در یک مدل موش صحرایی ماده نشان دادیم که بسیاری از تغییرات رخ داده در زنان مبتلا به PCOS را تقلید می‌کند. موش‌های صحرایی ماده گروه دریافت‌کننده DHEA افزایش سطوح تستوسترون تام، BUN، Cr، GFR و دفع مطلق سدیم و پتاسیم را نشان دادند. در تایید این موضوع، در بافت‌های تخمدان و کلیه نیز بسیاری از علائم هیستومورفولوژیکی و هیستومورفومتری غیرطبیعی مشهود بود. در این مدل از PCOS، چگونگی و میزان آسیب کلیوی مرتبط با هایپراندرژنمی تا حدی روشن شد. در واقع، هایپراندرژنمی باعث ایجاد ناهنجاری‌های سیستمیک از طریق مکانیسم‌های مختلف شده و به دنبال آن آسیب به نسبت شدیدی در بافت کلیه روی می‌دهد. ما امیدواریم استفاده از این مدل به ما و سایر محققان اجازه دهد تا در آینده بتوانیم مکانیسم‌های احتمالی که آندروژن‌ها باعث ایجاد بیماری کلیوی در زنان مبتلا به PCOS می‌شوند را هر چه بیشتر روشن سازیم.

قدردانی‌ها

از مرکز تحقیقات بیماری‌های کلیوی شیراز و مسئولین برج پژوهشی محمد رسول الله (ص) دانشگاه علوم پزشکی شیراز بابت همکاری صمیمانه، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

همچنین با افزایش وزن بدن، چه در انسان و چه در حیوانات آزمایشگاهی، افزایش در GFR مشاهده می‌گردد. بنابراین، افزایش وزن بدن ناشی از تزریق DHT نیز می‌تواند در این موضوع نقش داشته باشد.^{۳۰} در مقاله حاضر، داده‌های گلوکز سرم و وزن بدن حیوانات نشان داده نشده است، اما این داده‌ها در پروژه تحقیقاتی اصلی اندازه‌گیری شده‌اند و این موضوع را تایید می‌کنند که حیوانات در اثر تزریق ۲۸ روزه DHEA دچار یک وضعیت پیش‌دیابتی نیز می‌شوند. همچنین در توجیه این مطلب که با وجود افزایش کراتینین سرم، شاهد تغییرات فاحش در میزان GFR نبوده‌ایم، باید اشاره کرد که تحقیقات پایه‌ای گذشته به وضوح نشان داده‌اند که آندروژن‌ها می‌توانند به صورت مستقیم بر ترشح کراتینین از توبول پروگزیمال تاثیر بگذارند^{۳۴} و در نتیجه در حضور مقادیر بالای آندروژن‌ها مانند شرایط بیماری PCOS یا مدل‌های حیوانی این سندرم، می‌توان شاهد افزایش کراتینین سرم به صورت مستقل بود. بر این اساس، هماهنگ نبودن تغییرات کراتینین و GFR در مطالعه حاضر، احتمالاً به اثرات مستقیم آندروژن‌ها روی توبول پروگزیمال نیز مربوط است. افزایش سطح سرمی BUN و Cr نشان‌های از وخامت عملکرد گلوبولین است که با گذشت زمان باعث نارسایی کلیه می‌شود.^{۳۵} همچنین، گزارش شده که برای انسان، Cr سرم، با توجه به ارتباط بیشتر با برخی ویژگی‌های بالینی، ممکن است مقیاس دقیق‌تری در مقایسه با کلیرانس Cr برای پیش‌بینی GFR باشد. این اختلال در عملکرد گلوبولین معمولاً با افزایش BUN نیز همراه است. در مراحل اولیه بیماری کلیوی، غلظت سرمی Cr از سطح BUN قابل توجه‌تر است. از سوی دیگر، در مراحل اولیه بیماری‌های کلیوی، سطح BUN تنها پس از ایجاد آسیب واضح پارانشیمی کلیه شروع به افزایش می‌کند.^{۳۶} همچنین، افزایش میکروآلبومینوری در زنان جوان مبتلا به PCOS با شیوع سندرم متابولیک و فشار خون بالا ارتباط دارد.^{۳۷} نتایج ما نیز نشان داد که تجویز DHEA به مدت ۲۸ روز در موش‌های صحرایی ماده اسپراگ-داولی باعث افزایش قابل توجه سطح پلاسمایی Cr و BUN می‌شود که نشان‌دهنده شروع آسیب‌های جدی کلیوی است. همچنین در تایید این موضوع، آسیب گلوبولین‌ها و توبول پروگزیمال در بافت کلیه مشهود بود. بنابراین مطالعه حاضر توانسته است تا حد زیادی در روشن شدن چگونگی آسیب‌های کلیوی ناشی از هایپراندرژنمی موثر باشد.

مطالعات دیگری نیز نقش تستوسترون را در آسیب کلیه مرتبط با PCOS بررسی کرده‌اند. نتایج آنها نشان داد که بین

مشارکت پدیدآوران

نیما فرقانی و فاطمه مسجدی اجرای مطالعه و تهیه دست-نوشته را عهده داشتند. زینب کریمی، مختار مختاری و مهرداد شریعتی طراحی و تحلیل نتایج مطالعه را انجام دادند. همچنین تمامی نویسندگان نسخه نهایی دست‌نوشته را خوانده و تایید کرده‌اند.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال پژوهش حاضر در زمان تصویب با شناسه IR.SUMS.REC.1398.156 مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز قرار گرفت و طی انجام مراحل آن، مطابق با دستورالعمل کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با حیوانات برخورد شد.

منابع مالی

این مقاله از رساله دکتری خانم نیما فرقانی، نویسنده اول مقاله، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون استخراج شده است. همچنین این تحقیق با تامین برخی منابع مالی (شماره گرنت: ۱۸۹۵۷-۹۷) از دانشگاه علوم پزشکی شیراز پشتیبانی شده است.

تعارض منافع

تعارض منافع مالی و معنوی بین نویسندگان مقاله وجود ندارد و نویسندگان مقاله وجود هرگونه تعارض احتمالی منافع در رابطه با مقاله را رد می‌کنند.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

References

1. Wolf WM, Wattick RA, Kinkade ON, Olfert MD. Geographical Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome as Determined by Region and Race/Ethnicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018;15(11):2589. doi: 10.3390/ijerph15112589
2. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 2004;19(1):41-7. doi: 10.1093/humrep/deh098
3. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;7(4):219-31. doi: 10.1038/nrendo.2010.217
4. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Human Reproduction Update*. 2014;20(3):334-52. doi: 10.1093/humupd/dmt061
5. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*. 2008;14(4):367-78. doi: 10.1093/humupd/dmn015
6. Glintborg D. Endocrine and metabolic characteristics in polycystic ovary syndrome. *Danish Medical Journal*. 2016;63(4):B5232.
7. Behboudi-Gandevani S, Amiri M, Bidhendi Yarandi R, Noroozadeh M, Farahmand M, Rostami Dovom M, et al. The risk of metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2018;88(2): 169-84. doi: 10.1111/cen.13477
8. Cooney LG, Lee I, Sammel MD, Dokras A. High prevalence of moderate and severe depressive and anxiety symptoms in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2017;32(5):1075-91. doi: 10.1093/humrep/dex044
9. Kahal H, Kyrou I, Tahrani AA, Randeve HS. Obstructive sleep apnoea and polycystic ovary syndrome: A comprehensive review of clinical interactions and underlying pathophysiology. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2017;87(4):313-9. doi: 10.1111/cen.13392
10. Yu HF, Chen HS, Rao DP, Gong J. Association between polycystic ovary syndrome and the risk of pregnancy complications: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(51):e4863. doi: 10.1097/md.0000000004863
11. Nigam SK, Bush KT. Uraemic syndrome of chronic kidney disease: altered remote sensing and signalling.

- Nature Reviews Nephrology. 2019;15(5):301-16. doi: 10.1038/s41581-019-0111-1
12. Piccoli GB, Alrukhaimi M, Liu ZH, Zakharova E, Levin A. Women and kidney disease: reflections on World Kidney Day 2018: Kidney Health and Women's Health: a case for optimizing outcomes for present and future generations. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(2):189-93. doi: 10.1093/ndt/gfx358
 13. Caglar GS, Oztas E, Karadag D, Pabuccu R, Eren AA. The association of urinary albumin excretion and metabolic complications in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011;154(1):57-61. doi: 10.1016/j.ejogrb.2010.08.024
 14. Patil CN, Racusen LC, Reckelhoff JF. Consequences of advanced aging on renal function in chronic hyperandrogenemic female rat model: implications for aging women with polycystic ovary syndrome. *Physiological reports*. 2017 Nov;5(20):e13461. doi: 10.14814/phy2.13461
 15. Neisy A, Zal F, Seghatoleslam A, Alaei S. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine GLUT4 and ER α gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reproduction, Fertility and Development*. 2019 Jan 21;31(2):315-23.
 16. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction*. 2012;149:1-12. doi: 10.1095/biolreprod.111.097808
 17. Mesbah F, Moslem M, Vojdani Z, Mirkhani H. Does metformin improve in vitro maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *Journal of Ovarian Research*. 2015;8:74. doi: 10.1186/s13048-015-0203-x
 18. Kim E-J, Jang M, Choi JH, Park KS, Cho I-H. An Improved Dehydroepiandrosterone-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Post-pubertal Improve PCOS's Features. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:735. doi: 10.3389/fendo.2018.0735
 19. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *Journal of Reproductive Immunology*. 2004;64(1-2):59-74. doi: 10.1016/j.jri.2004.04.002
 20. Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, Zhang H, et al. Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gender Medicine*. 2011;8(2):103-15. doi: 10.1016/j.genm.2010.11.013
 21. Dalmaso C, Maranon R, Patil C, Bui E, Moulana M, Zhang H, et al. Cardiometabolic Effects of Chronic Hyperandrogenemia in a New Model of Postmenopausal Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 2016;157(7):2920-7. doi: 10.1210/en.2015-1617
 22. Weldegiorgis M, de Zeeuw D, Heerspink HJ. Renal end points in clinical trials of kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2015;24(3):284-9. doi: 10.1097/mnh.0000000000000118
 23. Palatini P. Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1708-14. doi: 10.1093/ndt/gfs037
 24. Harvey AM, Malvin RL. The effect of androgenic hormones on creatinine secretion in the rat. *J Physiol*. 1966;184(4):883-8. doi: 10.1113/jphysiol.1966.sp007954
 25. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1993;125(2):97-104. doi: 10.1007/bf00936438
 26. Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, Ucar M, et al. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology*. 2005;207(2):169-77. doi: 10.1016/j.tox.2004.08.024
 27. Patel AA, Bloomgarden ZT, Futterweit W. Premicroalbuminuria in women with polycystic ovary syndrome: a metabolic risk marker. *Endocrine Practice*. 2008;14(2):193-200. doi: 10.4158/ep.14.2.193
 28. Song Y, Ye W, Ye H, Xie T, Shen W, Zhou L. Serum testosterone acts as a prognostic indicator in polycystic ovary syndrome-associated kidney injury. *Physiological Reports*. 2019;7(16):e14219. doi: 10.14814/phy2.14219
 30. Gewin LS. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule. *Matrix Biology*. 2018;68-69:248-62. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.006
 31. Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, Villaggio B, Gianiorio F, Traverso P, et al. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney International*. 2004;65(4):1252-61. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00497.x