



Effects of ghrelin and orexin A on aromatase gene expression in the ovaries of female rats androgenized in third day of birth

Maryam Rezaei, Azam Maghsoudi, Homayoun Khazali*, Fariba Mahmoudi

Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 15 May 2013

Accepted: 29 Aug 2013

Abstract

Introduction: Ghrelin and Orexin A exert inhibitory effects on gonadotropins secretion. Aromatase is a key enzyme in the steroidogenesis pathway which converts testosterone to the estradiol. Treatment of neonatal female rats with testosterone propionate (TP) alters gonadotropin secretion patterns in the adulthood. In the present study the effects of central injection of ghrelin or orexin A on the expression of aromatase gene in the ovaries of pubertal androgenized female rats.

Methods: Forty two neonatal female rats were androgenized on the third day after birth by subcutaneous injection of 50µg TP and 6 neonatal female rats in one group received subcutaneous injection of olive oil as controls. After puberty, the animals in seven groups (n=6 in each group) received central injections of saline, different doses of ghrelin (2, 4 or 8µg) or Orexin A (2, 4 or 8µg). The ovaries were removed bilaterally and frozen. Aromatase gene expression levels was determined by semi quantitative RT-PCR.

Results: The mRNA levels of aromatase (CYP19) increased significantly in the ovaries of the androgenized rats compared to the control group. Orexin A and ghrelin injections significantly decreased aromatase gene expression compared to the androgenized rats ($P < 0.05$).

Conclusion: Androgens may stimulate aromatase gene expression in the ovaries. Orexin A and ghrelin may exert inhibitory effects on reproductive axis partly via reducing the expression of genes involved in the steroidogenesis.

Key words: Ghrelin, Orexin A, Aromatase, Androgenized rats

* Corresponding author e-mail: hkhazali@hotmail.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثرات گرلین و ارکسین A بر بیان ژن آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی ماده آندروژنه شده در سومین روز بعد از تولد

مریم رضایی، اعظم مقصودی، همایون خزعلی*، فریبا محمودی
دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۷ شهریور ۹۲

دریافت: ۲۵ اردیبهشت ۹۲

چکیده

مقدمه: گرلین و ارکسین A اثرات مهاری بر ترشح گنادوتروپین‌ها اعمال می‌کنند. آروماتاز آنزیم کلیدی در مسیر بیوستز استروئیدهای جنسی است که تبدیل تستوسترون به استروژن را کاتالیز می‌کند. تیمار موش‌های صحرایی ماده تازه متولد شده با تستوسترون پروپیونات (TP) الگوی ترشح گنادوتروپین‌ها در بلوغ را تغییر می‌دهد. در این تحقیق اثرات تزریق مرکزی گرلین و ارکسین A بر بیان ژن آروماتاز در تخمدان موش‌های آندروژنه (AND) بالغ بررسی شد.

روش‌ها: چهل و دو سر موش صحرایی ماده در روز سوم بعد از تولد با تزریق TP آندروژنه شدند و ۶ سر موش صحرایی ماده با تزریق روغن زیتون به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. بعد از بلوغ حیوانات در ۷ گروه به ترتیب تزریق مرکزی سالین یا مقادیر مختلف گرلین یا ارکسین A (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را دریافت کردند. تخمدان‌ها به صورت دو طرفه خارج و فریز شدند. میزان بیان ژن آروماتاز با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR تعیین شد.

یافته‌ها: سطح بیان mRNA آروماتاز (CYP19) در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش دادند ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: ممکن است آندروژن‌ها اثر تحریکی بر میزان بیان آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی ماده اعمال کنند. ممکن است گرلین و ارکسین A از طریق کاهش بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز در کاهش فعالیت محور تولید مثلی در موش‌های صحرایی آندروژنه نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: گرلین، ارکسین A، آروماتاز، موش‌های صحرایی آندروژنه

مقدمه

گنادی و ترشح گنادوتروپین‌ها نقش ایفا می‌کند [۸، ۲۹، ۳۳]. اثرات آن بر محور تولید مثلی و ترشح LH در موش‌های بالغ به صورت دوگانه می‌باشد به گونه ای که در تعدادی از مطالعات اثر تحریکی و اکثر تحقیقات اثرات مهاری آن بر آزادسازی GnRH/LH گزارش شده است [۳۵، ۳۷]. گرلین پپتید ۲۸ آمینواسیدی است که در پاسخ به گرسنگی و تعادل منفی انرژی به طور عمده توسط معده و هسته‌های هیپوتالاموسی دخیل در تنظیم تعادل انرژی سنتز می‌شود. فرم آسیله و فعال گرلین به عنوان لیگاند گیرنده سکر تاگوگ هورمون رشد (GHSR-1a) عمل کرده و سبب افزایش ترشح هورمون رشد، دریافت غذا و وزن بدن می‌شود [۱۹]. مطالعات

فعالیت محور تولیدمثلی توسط برهم کنش بسیاری از پپتیدها و هورمون‌های محیطی و مرکزی نظیر گرلین، ارکسین و غیره کنترل می‌شود [۱۲، ۳۵]. ارکسین A پپتید هیپوتالاموسی با ۳۳ اسید آمینه است که به طور عمده در هیپوتالاموس جانبی و نواحی مجاور آن سنتز شده و آن از طریق اتصال به گیرنده شماره ۱ ارکسین (OX1R) در تنظیم دریافت غذا و تعدیل فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز -

hkhazali@hotmail.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

متولد شده ($n = 42$) از نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی) ۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپیونات [۲۷] را در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روغن زیتون از طریق تزریق زیر پوستی در روز سوم بعد از تولد دریافت کردند. تعداد شش موش صحرایی نیز با تزریق روغن زیتون به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 2 و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) نگهداری شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

کانول گذاری داخل بطنی و عمل تزریق: بعد از

بلوغ حیوانات در محدوده وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. کانول ساخته شده از سرسنگ تزریقی gauge ۲۲ با استفاده از دستگاه استرئوتاکسیک و با کمک سه عدد پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی در سطح جمجمه تثبیت شد [۲، ۶، ۲۴].

بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس، نوک کانول در مختصات بطن سوم ($DV=6/5$, $ML=0/0$, $AP=2/3$) قرار گرفت. حیوانات بعد از جراحی به قفسهای انفرادی برگردانده شدند و به آنها یک هفته اجازه بهبودی داده شد. بعد از یک هفته دوره بهبودی ۴۲ موش صحرایی در ۷ گروه (در هر گروه $n=6$) به ترتیب سالیین، گرلین (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) یا ارکسین A (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را در حجم ۳ میکرولیتر با استفاده از سرسنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هاملتون ۵ میکرولیتر وصل شده بود در ساعت ۱۰-۹ صبح دریافت کردند. شش سر موش صحرایی غیر آندروژنه به عنوان کنترل تزریق مرکزی سالیین را دریافت کردند. تستوسترون پروپیونات (Sigma, USA) در روغن زیتون و پپتیدهای گرلین (Anaspec, USA) و ارکسین A (Anaspec, USA) در سالیین حل شدند. دو ساعت بعد از تزریق با بیهوش کردن حیوانات تخمدانها جدا شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای -80°C سانتیگراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

مرحله استخراج RNA: نمونه های تخمدانی با

اخیر نشان داده اند که گرلین در کنترل عملکرد تولید مثلی نقش مهمی دارد و سبب کاهش ترشح هورمون های GnRH/LH و استروئیدهای گنادی در گونه های مختلف جانوری می شود [۱۰، ۱۸، ۲۶]. بیان گرلین و گیرنده آن در تخمدان گزارش شده است که اهمیت این ملکول را در عملکرد تخمدان نشان می دهد [۱۲]. تستوسترون هورمون استروئیدی است که می تواند مستقیماً به گیرنده های آندروژن متصل شود یا توسط آنزیم آروماتاز (سیتوکروم p450) به استرادیول (E2) آروماتیزه شود [۹]. آروماتاز یکی از آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتز هورمون های استروئیدی است که توسط ژن CYP19 کد می شود و به طور عمده در سلول های گرانولوزای تخمدانها بیان می شود. در فولیکول های در حال تکوین، آروماتاز سلول های گرانولوزا تحت تحریک FSH بیان می شود. همچنان که بلوغ فولیکولی پیشرفت می کند سلول های گرانولوزا گیرنده LH را نیز بیان می کنند و فعالیت آروماتاز تحت تحریک هر دو هورمون LH و FSH افزایش می یابد [۳۶]. تحقیقات نشان داده اند که تیمار موش های صحرایی ماده تازه متولد شده با تستوسترون پروپیونات (آندروژنه) موجب اثر گذاشتن روی ترشح گنادوتروپین ها و نازایی ناشی از عدم تخمک گذاری در دوران بلوغ می شود [۴]. تحقیقات هم چنین نشان داده اند که تیمار موش های صحرایی ماده تازه متولد شده با تستوسترون (در روز ۱-۵ام نوزادی) در بزرگسالی باعث عدم تخمک گذاری، عدم رهاسازی سرژ LH، کاهش پاسخدهی هیپوفیز به GnRH و نازایی می شود [۵]. از آنجا که تاکنون گزارشی درباره میزان بیان ژن آروماتاز در موش های صحرایی ماده بالغ آندروژنه تحت تیمار با گرلین و ارکسین A وجود ندارد، هدف از این مطالعه بررسی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش های ماده ی آندروژنه تیمار شده با مقادیر مختلف گرلین و ارکسین A است تا بررسی شود که آیا ارکسین و گرلین احتمال دارد از طریق کاهش میزان بیان ژن های دخیل در استروئیدوژنز در کاهش فعالیت محور تولیدمثلی نقش داشته باشند.

مواد و روش ها

واحدهای آزمایشی: موش های صحرایی ماده تازه

actin antisense: 5'-
GCTAGAAGCATTTCGCGGTGGA-3';
Aromatase sense: 5'-
GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-3' and
Aromatase antisense: 5'-
CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3'

است [۱۱]. محصولات β -اکتین و آروماتاز حاصل از تشدید ژنی به ترتیب ۵۱۱ و ۲۸۹ جفت بازی هستند. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ آمیزی safe view نمایان شده و توسط نرم افزار ImageJ کمی شدند. نتایج حاصل از نرم افزار ImageJ به صورت واحدهای اختیاری بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل به صورت

میانگین \pm SE ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T-test جفت نشده، آزمون ANOVA یکطرفه و نرم افزار SPSS آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با پست آزمون توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده نتایج با $P < 0.05$ معنی دار گزارش شدند.

یافته‌ها

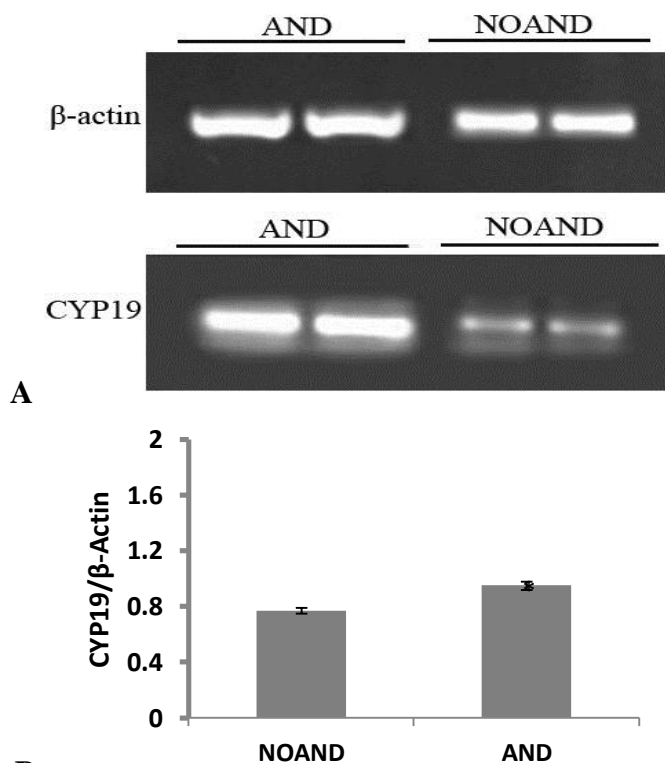
فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه نسبت به موش‌های صحرایی کنترل (غیر آندروژنه) به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۱A). سطح mRNA β -اکتین (که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه و موش‌های صحرایی کنترل مشاهده شد. شکل ۱B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم افزار ImageJ (میانگین داده‌های به دست آمده از ۶ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد. اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل ۱B تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند ولی همان طور که در شکل ۱B ملاحظه می‌شود سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه نسبت به موش‌های صحرایی کنترل به طور معنی داری بالاتر است (شکل ۱B) ($P < 0.05$) ($T=4/427, P=0.001$).

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های

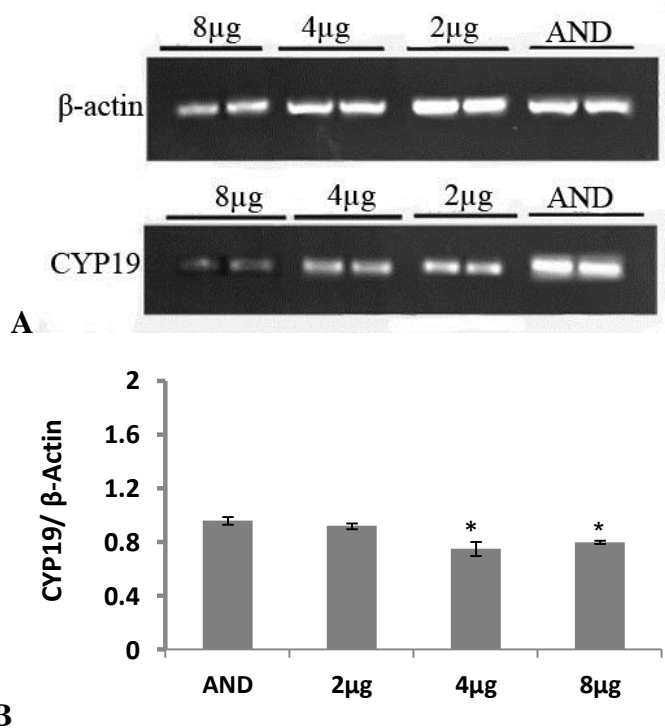
استفاده از pureZol و دستگاه بید میل هموژنایزر هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها بر اساس روش فنل کلروفرم و با استفاده از pureZole کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت PureZol (Bio Rad, U.S.A) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (تهیه شده از شرکت سیناژن) حل شد و تا زمان سنتز cDNA در فریزر -20°C درجه سانتیگراد نگهداری گردید. غلظت RNA با خواندن میزان جذب RNA در ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. همچنین، میزان خلوص RNA با خواندن میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر و بر اساس نسبت جذب $260/280$ محاسبه گردید. این نسبت برای نمونه‌های خالص RNA برابر 1.8 ± 0.2 می‌باشد.

مرحله سنتز cDNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR): cDNA تک رشته ای با استفاده از $5 \mu\text{g}$ از RNA مطلق، پرایمر پلی تیمین، آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA و کیت سنتز (vivantis, Malaysia) cDNA بر طبق دستورالعمل کیت توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد. از آنجا که β -اکتین به طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله مغز و تخمدان سنتز می‌شود، تعیین سطح mRNA آن توسط روش RT-PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA آروماتاز استفاده شد. برای انجام PCR نمونه‌های cDNA برای ۳۵ چرخه (94°C برای ۲ دقیقه، 94°C برای ۳۰ ثانیه، 61°C برای ۳۰ ثانیه، 72°C برای ۳۰ ثانیه) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، (۲ میکرولیتر) cDNA template، (۵ میکرولیتر) بافر PCR $10\times$ ، (۱/۵ میکرولیتر) 50 mM MgCl_2 ، (۱ میکرولیتر) 10 mM dNTPs ، (۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها) پرایمرهای سنس و آنتی سنس ۱۰۰ میکرومولار، (۰/۲۵ میکرولیتر) $1/25 \text{ U}$ آنزیم DNA پلیمرز Taq، (۳۸/۲۵ میکرولیتر) آب استریل بر حسب دستورالعمل کیت PCR (Bio RAD, U.S.A) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) تشدید ژنی شدند. توالی‌های الیگونیوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی سنس β -اکتین و آروماتاز به ترتیب برابر با:

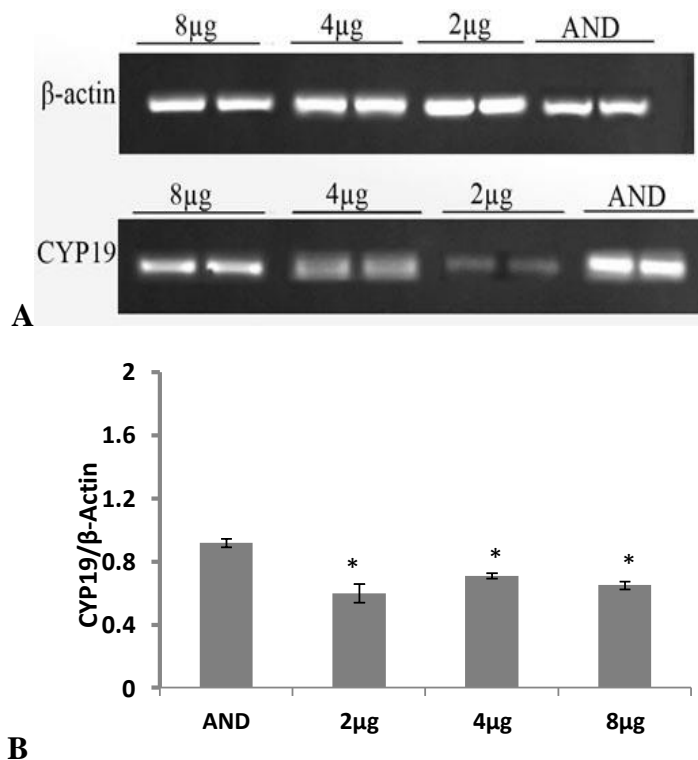
5'-
 β -actin sense: GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' and β -



شکل ۱- فراوانی سطح mRNA آروماتاز (CYP19) در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه نسبت به موش‌های صحرایی کنترل (غیر آندروژنه). قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های β -اکتین و آروماتاز تشدید شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می دهد. قسمت B میانگین سطح آروماتاز در هر گروه (=۶ تعداد) را نشان می دهد که توسط نرم افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β -mRNA-اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است ($p < 0.05$): AND: آندروژنه، NOAND: غیر آندروژنه).



شکل ۲- فراوانی سطح mRNA آروماتاز (CYP19) در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر مختلف ارکسین A. قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های β -اکتین و آروماتاز تشدید شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می دهد. قسمت B میانگین سطح آروماتاز در هر گروه (=۶ تعداد) را نشان می دهد که توسط نرم افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β -mRNA-اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است ($p < 0.05$): AND: آندروژنه).



شکل ۳- فراوانی سطح mRNA آروماتاز (CYP19) در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با سه مقادیر مختلف گرلین، قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های β -اکتین و آروماتاز تشدید شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می دهد. قسمت B میانگین سطح آروماتاز در هر گروه (۶=تعداد) را نشان می دهد که توسط نرم افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β -mRNA-اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (AND: آندروژنه). ($p < 0.05$)

موش‌های صحرایی تیمار شده با مقادیر ۴ و ۸ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های کنترل آندروژنه به طور معنی داری پایین تر است (شکل ۲B) ($P < 0.05$) ($F = 13.053, P = 0$).

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داده است که فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با دوز ۲، ۴ و ۸ میکروگرم گرلین نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۳A). سطح mRNA β -اکتین (که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با ارکسین و موش‌های صحرایی کنترل مشاهده شد. شکل ۲B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای کنترل مشاهده شد. شکل ۳B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم افزار ImageJ (میانگین داده های به دست آمده از ۶ رت در هر گروه) را نشان می‌دهد. اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل ۳B تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند ولی همان طور که ملاحظه می‌شود سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با مقدار ۲ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های کنترل آندروژنه کاهش معنی داری پیدا نکرد، در حالی که سطح mRNA آروماتاز در تخمدان

صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقدار ۲ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه به طور معنی داری کاهش نیافت، در حالی که فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تیمار با مقادیر ۴ و ۸ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۲A). سطح mRNA β -اکتین (که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با ارکسین و موش‌های صحرایی کنترل مشاهده شد. شکل ۲B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم افزار ImageJ (میانگین داده های به دست آمده از ۶ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد. اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل ۲B تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند ولی همان طور که ملاحظه می‌شود سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با مقدار ۲ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های کنترل آندروژنه کاهش معنی داری پیدا نکرد، در حالی که سطح mRNA آروماتاز در تخمدان

تخمک گذاری را بر عهده دارد تخریب می کند [۵]. در حالی که بر روی تعداد و شکل خود نورون های GnRH اثری ندارد. نشان داده شده که سرژ LH با جلوگیری از رونویسی ژن آروماتاز، موجب کاهش mRNA آروماتاز می گردد [۲۹، ۳۱]. از آنجا که در موش های آندروژنه شده سرژ LH وجود ندارد در نتیجه حدس زده می شود که کاهش بیان آروماتاز توسط سرژ LH در فولیکول پیش از تخمک گذاری در موش های آندروژنه صورت نمی گیرد و بیان آن در سطح بالاتری نسبت به موش های کنترل باقی می ماند.

همچنین در این تحقیق برای اولین بار مشخص شد که فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با ارکسین A نسبت به موش های صحرایی آندروژنه به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. تاکنون مشخص شده است که اثر ارکسین روی سیستم تولیدمثلی و ترشح هورمون LH در موش های بالغ، اثری دوگانه است، ولی اکثر مطالعات اثرات مهاری آن بر فعالیت محور تولیدمثلی را گزارش کرده اند. این احتمال وجود دارد که اثر مهاری ارکسین بر نورون های GnRH به صورت غیر مستقیم و از طریق فعال کردن سایر نورون های موجود در ناحیه پره اپتیک که رسپتور شماره ۱ ارکسین (OXR1) را هم بیان می کنند و اثر مهاری بر نورون های GnRH دارند این عمل را انجام دهد [۳۰، ۳۷]. حدود ۸۵٪ نورون های GnRH گیرنده OXR1 را بیان می کنند و ۷۵-۸۵٪ نورون های GnRH در ارتباط مستقیم با نورون های ارکسین می باشند. بنابراین به احتمال زیاد ارکسین از طریق اثر مستقیم بر نورون های GnRH سبب مهار گنادوتروپین ها می شود [۳۱]. در یکسری آزمایشات دیگر، ارکسین A، بعد از تزریق در هسته آرکتوت و ناحیه برجستگی میانی اثر مهاری خویش بر رهاسازی پالسی LH را نشان داده است. فرض بر این است که ارکسین A به طور مستقیم رهاسازی GnRH را از پایانه های نورونی ناحیه برجستگی میانی مهار می کند و یا شاید به صورت غیر مستقیم در پره اپتیک میانی، هسته آرکتوت و ناحیه برجستگی میانی و از طریق سیستم های مهاری دیگر نظیر β -اندورفین و یا γ -آمینوبوتیریک اسید که سبب مهار GnRH می شود، این عمل را انجام می دهد [۳۵]. زیرا نشان داده شده است که پایانه های نورونی ارکسین A، با

میکروگرم گرلین نسبت به موش های کنترل آندروژنه به طور معنی داری پایین تر است (شکل ۳B) $(F=20/45, P=0)(P<0.05)$.

بحث

نتایج نشان داد که میزان بیان ژن آروماتاز در تخمدان موش های صحرایی آندروژنه نسبت به موش های صحرایی کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. احتمال دارد افزایش بیان آروماتاز با افزایش ترشح FSH در ارتباط باشد. تحقیقات پیشین گزارش کرده اند که هورمون FSH به عنوان اصلی ترین محرک بیان آروماتاز، مسیرهای واسطه تحریکی نظیر مسیر PKA/ cAMP و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز PI3K PKA/ را فعال می کند [۳۶، ۳۸]. تیمار موش های ماده تازه متولد شده با تستوسترون پروپیونات باعث افزایش سطح پلاسمایی FSH در دوران بزرگسالی می شود [۷]. بنابراین احتمال دارد افزایش سطح پلاسمایی FSH موجب افزایش فعالیت مسیرهای PKA/ cAMP و PKA/ PI3K و در نهایت باعث افزایش بیان آروماتاز در سلول های گرانولوزای تخمدان شود. آندروژن ها به صورت غیر مستقیم و بواسطه کاهش فولیستاتین و افزایش فراوانی اکتیوین و افزایش فسفریلاسیون smad2,3 باعث افزایش بیان ژن FSH β می شود. زیر واحد β اکتیوین بوسیله گنادوتروف ها تولید می شود و فعالیت پروموتور و رونویسی زیر واحد FSH β را افزایش می دهد [۲۸، ۳۲، ۳۳]. عمل اکتیوین بوسیله فولیستاتین تنظیم می شود. فولیستاتین گلیکوپروتئینی که در هیپوفیز بوسیله سلول های گنادوتروف و فولیکولوستلات تولید و به اکتیوین متصل می شود و از ترشح FSH جلوگیری می کند. تستوسترون ترشح و بیان mRNA فولیستاتین هیپوفیز را کاهش می دهد. بنابراین در حضور تستوسترون و دهیدروتستسترون mRNA آروماتاز بالاترین سطح بیان را دارد که نشان دهنده این است که آندروژن ها به طور بالقوه بیان و فعالیت ژن آروماتاز را تعدیل می کنند [۱۶، ۱۹، ۳۴]. مطالعات پیشین هم چنین نشان داده اند که تیمار نوزادی موش های ماده با تستوسترون پروپیونات، نورون های آوران GnRH را که کنترل سرژ LH در هسته پری اپتیک قبل از

از اجزای ضروری کنترل محور HPG می‌باشند و سبب افزایش ترشح GnRH و گنادوتروپین‌ها می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که گرلین از طریق مهار سیستم پیام‌رسانی کیس‌پپتین/GPR54 و در نتیجه مهار ترشح GnRH و گنادوتروپین می‌شود [۱، ۱۱]. بنابراین احتمال دارد گرلین با مهار بیان تنظیم‌کننده Kiss1 در هیپوتالاموس، باعث کاهش GnRH گنادوتروپین‌ها و به دنبال آن با کاهش ترشح LH و FSH سبب کاهش بیان ژن آروماتاز شود. نشان داده شده است که گرلین سبب افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) شده و تزریق آن سبب افزایش ترشح ACTH و کورتیزول می‌شود [۲]. افزایش فعالیت محور HPA به نوبه خود سبب کاهش فعالیت محور HPG و کاهش سطح FSH β mRNA می‌شود [۳]. بنابراین، گرلین ممکن است با افزایش فعالیت H-P-A سبب کاهش بیان ژن آروماتاز شود. همچنین در مطالعاتی نشان داده شده است که هورمون هیپوفیزی پرولاکتین بواسطه فعال کردن پروتئین کیناز C و تیروزین کیناز اثرات مهاری خود را روی فرایند سنتز استروژن تحت تحریک FSH (بیان آروماتاز) اعمال می‌کند [۲۱]. از طرفی اثرات تحریکی گرلین روی ترشح پرولاکتین هم ثابت شده است [۲۳]. بنابراین احتمال دارد گرلین از طریق تحریک ترشح پرولاکتین باعث مهار هورمون FSH و کاهش بیان آنژیم آروماتاز شود. از طرفی نشان داده شده است که گرلین باعث افزایش سطح mRNA نوروپپتید Y و پپتید آگوتی در هسته آرکوت هیپوتالاموس می‌شود [۲۲]. همچنین مشخص شده است که تحریک نورون‌های NPY و AgRP سبب افزایش ترشح نوروترانسمیتر GABA از پایانه آکسونی این نورون‌ها می‌گردد. از آنجا که پپتیدهای Npy و AgRP و نوروترانسمیتر GABA اثرات مهاری بر فعالیت محور تولیدمثلی اعمال کرده و باعث کاهش رهایی GnRH و بدنبال آن LH و FSH می‌شوند در نتیجه تزریق مرکزی گرلین بواسطه افزایش سطح نوروپپتید Y، پپتید آگوتی و نوروترانسمیتر گابا باعث مهار رهایی گنادوتروپین‌ها (LH, FSH) و بدنبال آن کاهش بیان آروماتاز در سلولهای گرانولوزا تخمدان می‌شود [۱۷]. رسپتورهای GHS-R1a و GHS-R1b در سلولهای گرانولوزا تخمدان حضور دارند. که پیش‌بینی می‌شود گرلین که بصورت icv تزریق شد اثرات

این سیستم‌های مهاری هم‌مکانی داشته و سبب تغییر رهاسازی آنها نیز می‌شود [۱۴]. از طرفی تحقیقات نشان داده‌اند که در ناحیه هیپوتالاموس جانبی نورون‌های ارکسین و نورون‌های نوروپپتید Y (NPY) که از ناحیه هسته کمائی پروژکت شده‌اند، در ارتباط مستقیم با هم هستند. مطالعات نشان داده رسپتورهای Y₁، Y₄ و Y₅ تنظیم‌کننده اعمال تولیدمثلی NPY هستند. اخیراً مشخص شده است رسپتور NPY Y₁ که سبب مهار رهاسازی LH می‌شود، در اکثر اجسام سلولی نورون‌های ارکسین در هیپوتالاموس جانبی و سایر مناطق هیپوتالاموس موجود است [۳۰]. بنابراین احتمالاً نورون‌های ارکسین با دریافت سیگنال‌های NPY از طریق رسپتورهای Y₁، می‌توانند سبب مهار رهاسازی LH شود. همچنین نشان داده شده است که در سلول‌های تکای تخمدان، آندروژن‌ها تحت تحریک LH تولید می‌شوند و سپس به عنوان پیش‌ساز سنتز استروژن در سلول‌های گرانولوزای تخمدانی تحت تحریک FSH/LH قرار می‌گیرند. آندروژن‌ها فعالیت تحریکی FSH در بیان آروماتاز را در مرحله‌ی اولیه از تکوین فولیکولی با افزایش سطح cAMP افزایش می‌دهد، اما در طی مراحل پایانی آن، آنها به طور عمده به عنوان پیش‌ساز سنتز استروژن به کار گرفته می‌شود [۳۶]. بنابراین حدس زده می‌شود که ارکسین A از طریق مهار آزادسازی پالسی GnRH و LH موجب کاهش تولید آندروژن‌ها در سلول‌های تکای تخمدان می‌شود. بنابراین عمل تحریکی آندروژن‌ها بر FSH در مسیر بیان آروماتاز کاهش می‌یابد. در نتیجه موجب کاهش بیان آروماتاز در تخمدان موش‌های آندروژنه تیمار شده با ارکسین A می‌شود. هم‌چنین در این تحقیق مشخص شد که فراوانی سطح mRNA آروماتاز در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با گرلین نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مطالعات پیشین در نشخوارکنندگان، جوندگان و انسان گزارش شده است که گرلین پپتیدی ارکسینرژیک با اثرات مهاری بر محور تولیدمثلی می‌باشد و تزریق آندروژن آن سبب کاهش سطح LH و FSH و هورمون‌های استروئیدی گنادها، تأخیر در فرایند بلوغ و ناباروری می‌شود. اخیراً ثابت شده است که کیس‌پپتین و گیرنده آن (سیستم پیام‌رسانی کیس‌پپتین/GPR54)

تخمندان موش‌های صحرایی آندروژنه می‌شود.

سپاسگزاری

از همکاری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران که در تامین هزینه‌های انجام این طرح ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی داریم.

کمی هم از طریق رسپتور های خود مستقیماً روی بیان ژن آروماتاز اعمال می کند و باعث مهار تولید استروژن در سلولهای گرانولوزا تخمدان می‌شود [۱۵].

به طور خلاصه یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که آندروژنه کردن باعث افزایش بیان ژن آروماتاز نسبت به کنترل می‌شود و همچنین تیمار با پپتیدهای گرلین و ارکسین A موجب کاهش معنی داری در بیان ژن آروماتاز در

References

- [1] Ahmed HH, Khalil KBW, Shousha WG, El-Sayed EM, Eskander EF, Selim RE, Molecular genetic and biochemical evaluation of ghrelin hormone as a novel signal of gonadal function in adult male rats. *JASMR* 5 (2010) 89-100.
- [2] Amoo-Raiabi O, Moghimi A, Khazali H, Effect of ICV injection of ghrelin and leptin on T3 and T4 plasma levels in Rat. *Physiol Pharmacol* 16 (2012) 70-78.
- [3] Gore AC, Attardi B, DeFranco DB, Glucocorticoid repression of the reproductive axis: Effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Mol Cell Endocrinol* 256 (2006) 40-48.
- [4] Barraclough CA, Production of anovulatory sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68 (1961) 62-7.
- [5] Barraclough CA, Gorski RA, Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68 (1961) 68-79.
- [6] Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS, Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 226 (1994) 1765-1770.
- [7] Burger LL, Haisenleder DJ, Wotton GM, Aylor KW, Dalkin AC, Marshall JC, The regulation of FSH beta transcription by gonadal steroids: testosterone and estradiol modulation of the activin intracellular signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (2007) E277-85.
- [8] De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, Van Den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG, The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 695 (1998) 322-7.
- [9] Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. *Horm Behav* 53 (2008) 673-692.
- [10] Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 82(2005) 245-255.
- [11] Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K, Effects of ghrelin on kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett* 460 (2009) 143-147.
- [12] Garcia MC, Lopez M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Die'guez C, Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 133 (2007) 531-540.
- [13] Genissel C, Carreau S, Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig Cells. *Mol Cell Endocrinol* 178 (2001) 141-146.
- [14] Irahara M, Tamura T, Matuzaki T, Orexin-A suppresses the pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2006) 232-236.
- [15] Isabella Viani, Alessandra Vottero, Francesco Tassi, Giulia Cremonini, Chiara Sartori, Sergio Bernasconi, Bruno Ferrari, Lucia Ghizzoni, Ghrelin Inhibits Steroid Biosynthesis by Cultured Granulosa-Lutein Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (2008) 1476-1481.

- [16] Kaiser UB, Lee BL, Carroll RS, Unabia G, Chin WW, Childs GV, Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology* 130 (1992) 3048-3056.
- [17] Klenke U, Constantin S, Wray S, Neuropeptide Y Directly Inhibits Neuronal Activity in a Subpopulation of Gonadotropin-Releasing Hormone-1 Neurons via Y1 Receptors. *Endocrinology* 151 (2010) 2736-2746.
- [18] Kluge M, Schussler P, Schmidt S, Uhr M, Steiger M, Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in women. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (2012) 448-451.
- [19] Kojima M, Hosada H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K, Ghrelin is a growthhormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (1999) 656-660.
- [20] Leal AM, Blount AL, Donaldson CJ, Bilezikjian LM, Vale WW, Regulation of folliclestimulating hormone secretion by the interactions of activin-A, dexamethasone and testosterone in anterior pituitary cell cultures of male rats. *Neuroendocrinology* 77 (2003) 298-304.
- [21] Luis AV, Isabel M, Sandra A, Fernando L, The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod* 2 (1996) 725-731.
- [22] Luisa MS, Miguel L, Sulay T, Felipe FC, Rosa SA, Agouti-Related Peptide, Neuropeptide Y, Carlos DG, and Somatostatin-Producing Neurons Are Targets for Ghrelin Actions in the Rat Hypothalamus. *Endocrinology* 144 (2003) 544-551.
- [23] Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulis P, Anifandis G, Messinis IE, Effect of ghrelin and thyrotropin-releasing hormone on prolactin secretion in normal women. *Horm Metab Res*. 42 (2010) 204-8.
- [24] Mahmoudi F, Mohsennezhad F, Khazali H, Ehtesham H, The Effect of Central Injection of Ghrelin and Bombesin on Mean Plasma Thyroid Hormones Concentration. *Iran J Pharm Res* 10 (2011) 627-632.
- [25] Mozid AM, Tringali G, Forsling ML, Hendricks MS, Ajodha S, Edwards R, Navarra P, Grossman AB, Korbonits M, Ghrelin is released from Rat Hypothalamic Explants and Stimulates Corticotrophin-releasing Hormone and Arginine-vasopressin. *Horm Metab Res* 35 (2003) 455-459.
- [26] Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, Ghe C, Arnoletti E, MattaceRaso G, Castellucci M, Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of reproductive function. *Peptides* 32 (2011) 2514-2521.
- [27] Murakami S, Arai Y, Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal treatment. *Neurosci let* 102 (1989) 185-190.
- [28] Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Cell-specific transcriptional regulation of folliclestimulating hormone by activin and gonadotropinreleasing hormone in the L_T2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142 (2001) 2284-2295.
- [29] Piper D, Upton N, Smith M, Hunter A, The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci* 12 (2000) 726-30.
- [30] Pu S, Jain MR, Kalra PS, KalraSP, Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept* 78 (1998) 133-136.
- [31] Rebecca E, Campbell M, Susan Smith¹, Summer E, Bernadette E, Jarlath MH, Kevin L, Grove orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci* 23 (2003) 1487-1497.
- [32] Roberts VJ, Peto CA, Vale W, Sawchenko PE, Inhibin/activin subunits is costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 56 (1992) 214-224.
- [33] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch J, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M, Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92 (1998) 573-85.
- [34] Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N, Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology* 128 (1991) 3313-3315.
- [35] Small CJ, Goubillon ML, Murray JF, Siddiqui A,

- Grimshaw SE, Young H, Central orexin a has site-specific effects on luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology* 144 (2003) 3225-3236.
- [36] Stocco C, Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* (2008) 473-487.
- [37] Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T, Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999) 759-62.
- [38] Tetsuka M, Hillier SG, Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Malec Biol* 61 (1997) 233-239.
- [39] Van Den Pol N, Gao K, Obrietan XB, Kilduff TS, Belousov AB, Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18 (1998) 7962-7971.
- [40] Weiss J, Guendner MJ, Halvorson LM, Jameson JL, Transcriptional activation of the follicle stimulating hormone-subunit gene by activin. *Endocrinology* 136 (1995) 1885-1891.