بررسی اثرات تزریق مرکزی گرلین بر بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی(*Rattus norvegicus*) آندروژنه شده در روز سوم تولد

- **علی خراسانی***: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
- **رضا فرتوت‌زاده**: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
- **همایون خزعلی**: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
- **فریبا محمودی**: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲

چکیده

گرلین اثرات مهاری بر ترشح گنادوتروپین‌ها اعمال می‌کند. محصول ژن TSPO به‌طور عمده در غشای خارجی میتوکندری یافت می‌شود و یکی از پروتئین‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز استروئیدهای جنسی است. گرلین، کلسترول را به‌داخل میتوکندری جهت سنتز هورمون‌های جنسی انتقال می‌دهد. تیمار موش‌های صحرایی ماده تازه متولد شده با تستوسترون پروپیونات (TP) الگوی ترشح گنادوتروپین‌ها را در بلوغ تغییر می‌دهد. دراین تحقیق اثرات تزریق مرکزی گرلین بر بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های آندروژنه بالغ بررسی شد. بیست سر موش صحرایی ماده در روز سوم بعد از تولد با تزریق TP آندروژنه شدند. بعد از بلوغ حیوانات در ٤ گروه به ترتیب تزریق مرکزی سالین یا مقادیر مختلف گرلین (۲، ٤ یا ۸ میکروگرم) را دریافت کردند و ٥ سر موش صحرایی ماده غیرآندروژنه نیز به‌عنوان گروه شاهد سالین را دریافت کردند. تخمدان‌ها به‌صورت دو طرفه خارج و فریز شدند. میزان بیان ژن TSPO با استفاده از روش نیمه‌کمی RT-PCR تعیین شد. سطح بیان mRNAی TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. تیمار با مقادیر مختلف گرلین میزان بیان ژن TSPO را در مقایسه با گروه شاهد آندروژنه به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<0/05$). آندروژن‌ها احتمال دارد اثر تحریکی بر میزان بیان TSPO درتخمدان موش‌های صحرایی ماده اعمال‌کنند. ممکن است گرلین از طریق کاهش بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز در کاهش فعالیت محور تولیدمثلی در موش‌های صحرایی آندروژنه نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: گرلین، TSPO، موش‌های صحرایی آندروژنه

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alikhorasani1987@gmail.com

مقدمه

فعالیت سیستم تولیدمثلی تحت کنترل مرکزی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی(HPG) است و توسط برهم‌کنش مجموعه پیچیده‌ای از پپتیدهای مرکزی و محیطی تنظیم می‌شود. از بین نوروپپتیدهای مرکزی موثر بر فعالیت محور تولیدمثلی می‌توان به گرلین اشاره کرد. گرلین پپتید ۲۸ آمینواسیدی است که در پاسخ به گرسنگی و تعادل منفی انرژی به‌طور عمده توسط معده و هسته‌های هیپوتالاموسی دخیل در تنظیم تعادل انرژی سنتز می‌شود. فرم آسیله و فعال گرلین به‌عنوان لیگاند گیرنده سکرتاگوگ هورمون رشد (GHSR-1a) عمل کرده و سبب افزایش ترشح هورمون رشد، دریافت غذا و وزن بدن می‌شود (۲۴). هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که گرلین در کنترل عملکرد تولیدمثلی نقش مهاری دارد و سبب کاهش ترشح هورمون‌های GnRH/LH و استروئیدهای گنادی در گونه‌های مختلف جانوری می‌شود (۱۴،۲۳،۲۸). پروتئین موسوم به گیرنده بنزودیازپینی محیطی(PBR) که امروزه به پروتئین ترانسلوکاتور (TSPO) معروف است پروتئینی ۱۸ کیلو دالتونی است که به‌طور عمده در غشای خارجی میتوکندری یافت می‌شود. پروتئین TSPO به‌طور عمده در غشای میتوکندریایی بافت‌های استروئیدوژنز نظیر تخمدان‌ها، بیضه‌ها و سایر بافت‌ها بیان می‌شود و در انتقال کلسترول به‌داخل میتوکندری سلول‌های سازنده استروئیدها نقش مهمی ایفا می‌کند (۳،۳۰،۷). تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که در فولیکول‌های در حال تکوین، TSPOی سلول‌های گرانولوزا تحت تحریک FSH بیان می شود. هم‌چنان که بلوغ فولیکولی پیشرفت می‌کند سلول‌های گرانولوزا گیرنده LH را بیان می‌کنند و فعالیت TSPO تحت تحریک هر دو هورمون LH و FSH افزایش می یابد (۲۷،۱۳). هم‌چنین مشخص شده است که تیمار موش‌های صحرایی ماده با آندروژن پس از تولد منجر به افزایش بسیار سطوح فعالیت TSPO در تخمدان شده و در نتیجه سیکل تولیدمثلی و رفتار تولیدمثلی جنس ماده را مختل می‌کند و باعث عدم تخمک‌گذاری، عدم رهاسازی سرژ LH، کاهش پاسخدهی هیپوفیز به GnRH و نازایی می‌شود (۳۷،۳۶). یافته‌ها ثابت کرده‌اند که توزیع نورون‌های ارکسین با نورون‌های تولید کننده GnRH در ناحیه برجستگی میانی و هسته آرکوئت (ARC) هم‌پوشانی داشته و گرلین در مهار آزادسازی هورمون‌های GnRH، LH و FSH دخالت دارد(۱). هورمون‌های LH و FSH هر دو در کنترل بیان پروتئین TSPO نقش دارند و هر عامل تغییردهنده ترشح هورمون‌های FSH و LH ممکن است در کاهش فعالیت استروئیدوژنز نقش داشته باشد. از آن‌جا که گرلین در تنظیم فعالیت محور تولیدمثلی نقش داشته و تاکنون گزارشی درباره اثرات گرلین بر میزان بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز در هیچ‌یک از گونه‌های جانوری آندروژنه وجود ندارد در این مطالعه، اثرات تزریق مرکزی گرلین بر میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های ماده بالغ آندروژنه بررسی می‌شود تا مشخص شود که احتمال دارد که پپتیدهای مهارکننده آزادسازی GnRH/LH و FSH در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز نقش داشته باشند.

مواد و روش‌ها

واحدهای آزمایشی: این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران، در سال ۱۳۹۱ انجام شد. موش‌های صحرایی ماده تازه متولد شده (۲۰ سر) از نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی) ۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپیونات (۲۹) را در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روغن زیتون در روز سوم بعد از تولد از طریق زیر پوستی دریافت کردند. پنج سر موش صحرایی نیز با تزریق روغن زیتون به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) نگهداری شدند و در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

کانول‌گذاری داخل بطنی و عمل تزریق: حیوانات بعد از بلوغ در محدوده وزنی ۱۸۰- ۲۲۰ گرم، با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلسین (۱۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. کانول ساخته شده از سرسرنگ تزریقی gauge ۲۲ با استفاده از دستگاه استریوتاکسیک و با کمک دو عدد پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی در سطح جمجمه تثبیت شد. بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس، میله مربوط به دندان پیشین فوقانی، ۳/۳ میلی‌متر پایین تر از خط مربوط به میله‌های گوشی و نوک کانول در مختصات بطن سوم (AP=۲/۳،ML=۰/۰،DV=۶/۵) قرار گرفت. حیوانات بعد از جراحی به قفس‌های انفرادی برگردانده شدند و به آن‌ها یک هفته اجازه بهبودی داده شد. پس از یک هفته دوره بهبودی ۲۰ سر موش صحرایی در چهار گروه (در هر گروه ۵= n)

به‌ترتیب تزریق درون بطن سوم مغزی سالین یا مقادیر مختلف گرلین (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را در حجم چهار میکرولیتر با استفاده از سرسرنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از طریق لوله رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتر وصل شده بود در ساعت ۱۲- ۱۰ صبح دریافت کردند. پپتید گرلین (Anaspec Co, USA) در آب مقطر حل شد. پنج سر موش صحرایی گروه شاهد نیز بعد از بلوغ در محدوده وزنی ۱۸۰تا ۲۲۰ گرم چهار میکرولیتر سالین را از طریق تزریق درون بطن سوم مغزی دریافت کردند. دو ساعت بعد از دریافت مواد مورد نظر حیوانات بی‌هوش شدند و تخمدان‌ها به‌صورت دو طرفه خارج شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری گردیدند.

مرحله استخراج RNA: نمونه‌های تخمدانی با استفاده از pureZol و دستگاه هموژنایزر هموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت PureZol (Bio Rad Co, U.S.A) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (تهیه شده از شرکت سیناژن، ایران) حل شد و تا زمان سنتز cDNA در فریزر ۲۰- 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 براساس نسبت جذب A۲۶۰/A۲۸۰ محاسبه گردید.

مرحله سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس(RT- PCR): cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ میکروگرم از RNA مطلق، پرایمر پلی تیمین، آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (vivantis Co, Malaysia) طبق دستورالعمل کیت به‌وسیله دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD Co, U.S.A) سنتز شد. از آن‌جا که ژن خانه‌دار β- اکتین به‌طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله تخمدان سنتز می‌شود. تعیین سطح mRNA آن توسط روش RT- PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNAی TSPO استفاده شد. برای انجام PCR نمونه‌های cDNA برای ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای۳۰ ثانیه) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر، sterile water (۳۸/۲۵ میکرولیتر) (۰/۲۵) U Taq DNA Polymerase ۱/۲۵ و ۱۰۰ میکرومتر از پرایمرهای sense and antisense (۱ میکرولیتر از هریک)، ۱۰ میلی‌مول dNTP Mix(۱ میکرولیتر)، ۵۰ میلی‌مول کلریدکلسیم (۱/۵ میکرولیتر)، 10× PCR buffer (۵ میکرولیتر)، cDNA template(۲ میکرولیتر) برحسب دستورالعمل کیت PCR (Bio RAD, Co. U.S.A) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, Co. U.S.A) تشدید ژنی شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس β- اکتین و TSPO به‌ترتیب برابر با :

β-actin sense: ۵′-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-۳′

β-actin antisense:۵′-GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA-۳′

TSPO sense: ۵′- AAGAGCTGGGAGGTTTCACA -۳′

TSPO antisense:۵ ′-CCAGGCCAGGTAAGGATACA -۳′

است(۲،۱۷).

محصولات β- اکتین و TSPO حاصل از تشدید ژنی به‌ترتیب ۵۱۱ و ۲۲۳ جفت بازی هستند. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ‌آمیزی safe view نمایان شده و توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شدند. نتایج حاصل از نرم‌افزار ImageJ به‌صورت واحدهای اختیاری بیان شد.

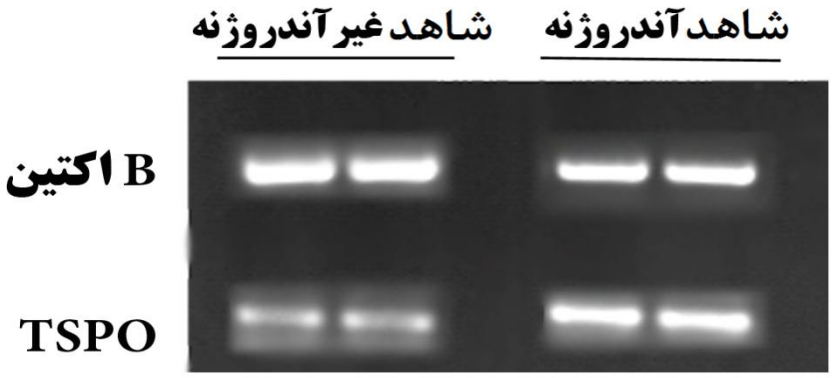
تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T- test جفت نشده، آزمون ANOVA یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده نتایج با P<۰/۰۵ معنی‌دار گزارش شدند.

نتایج

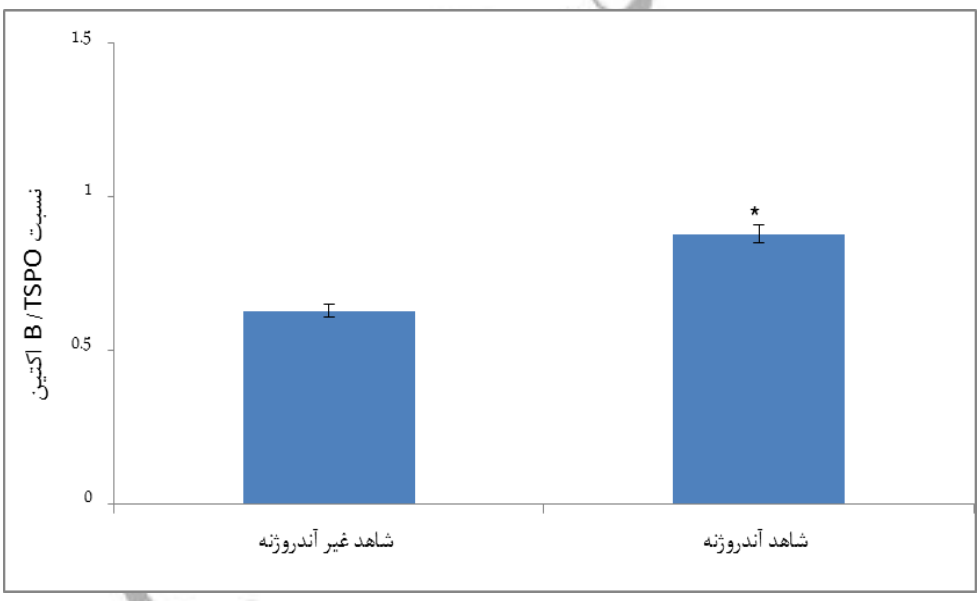
فراوانی سطح mRNAی TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکلA۱). سطح mRNAیβ-اکتین (که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده و شاهد مشاهده شد (شکلA۱). شکل B۱ آنالیز نیمه‌کمی تراکم باندهای حاصل از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به‌دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می دهد. اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل B۱ تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند ولی همان‌طورکه در شکل B۱ ملاحظه می شود سطح mRNAیTSPO در

تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر است (شکل ۱B).

۱A



۱B



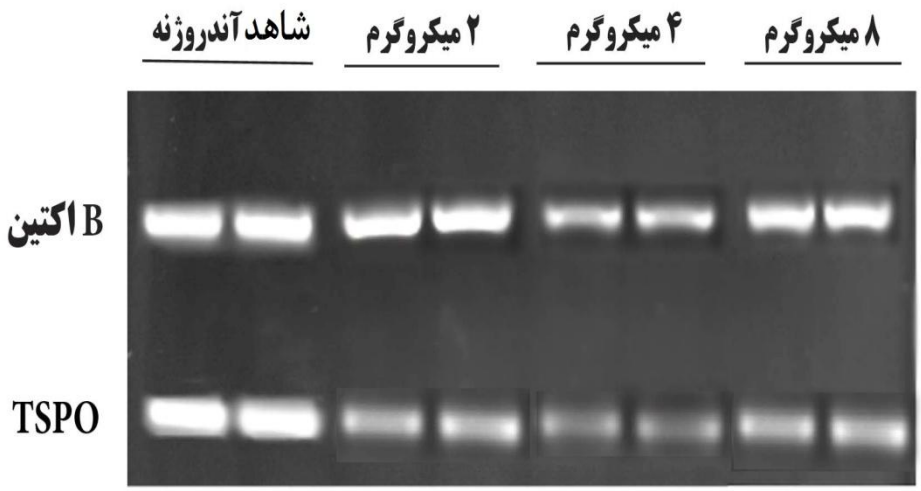
شکل۱ : فراوانی سطح mRNAی TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی شاهد

قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و TSPO تشدید شده توسط روش نیمه‌کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B میانگین سطح TSPO در هر گروه (۵= تعداد) را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β mRNA -اکتین برای نرمال کردن نتایج TSPO استفاده شده است.

هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی سطح mRNAی TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر ۲ و ۴ و ۸ میکروگرم گرلین در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه شاهد آندروژنه به‌ترتیب به میزان ۵۹، ۸۹ و ۶۸ درصد کاهش یافت و این میزان کاهش در هر سه گروه در مقایسه با گروه شاهد آندروژنه از نظر آماری معنی‌دار است (شکل۲A). سطحmRNAی β-اکتین (که به‌عنوان شاهد داخلی استفاده شده است) به‌میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با مقادیر مختلف گرلین و موش‌های صحرایی گروه شاهد آندروژنه

مشاهده شد (شکل۲A). شکل ۲B آنالیز نیمه‌کمی تراکم باندهای حاصل از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد. همان‌طورکه از نمودار مشخص است میانگین بیان ژن TSPO در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر ۲، ۴ یا و۸ میکروگرم گرلین در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه شاهد آندروژنه به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است (شکل ۲B).

۲A



۲B

شکل ۲: فراوانی سطح mRNAی TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین
قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و TSPO تشدید شده توسط روش نیمه‌کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B میانگین سطح TSPO در هر گروه (۵= تعداد) را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از mRNA β-اکتین برای نرمال کردن نتایج TSPO استفاده شده است.

بحث

موش‌های آندروژنه شده بـه‌دلیـل عـدم تخمـک‌گـذاری در دوران بلوغ دارای تخمدان‌هایی کوچک‌تر و تحلیل رفتـه نسـبت به موش‌های عادی هستند و در نتیجه نازا می‌باشند. هم‌چنین با اندازه‌گیری هورمون‌هایی مانندLH می‌توان بـه آندروژنـه شـدن موش‌های ماده پـی بـرد. تحقیقـات انجـام شـده در آزمایشـگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی هم‌چنین نتایج تحقیقات پیشین به‌خوبی ثابت کرده‌اند که سطح LH در موش‌های آندروژنه در سطح پایین‌تری نسبت به موش‌های عـادی اسـت (۱۲،۸،۲۵،۲۶). در ایـن مطالعـه اثـرات تزریـق زیرپوستی تستوسترون در موش صحرایی ماده در روز سوم بعـد از تولد بـر روی بیـان ژن TSPO در دوران بلـوغ بررسـی شـد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق زیرپوسـتی تستوسـترون بیـان ژن TSPO را نسـبت بـه گـروه شـاهد در دوران بلـوغ افـزایش می‌دهد. نتایج حاصل از این تحقیق منطبق بر تحقیقات پیشین است که گزارش کردند در موش‌های صحرایی نر و ماده آندروژنه شده در دوران جنینی و یا پس از تولد بیان ژن TSPO افزایش یافته است و آندروژن‌ها نقش اساسی در بیان TSPO تخمـدان ایفا می‌کنند (۲۷،۹).

تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، ثابت کرده است که TSPO یکی از پروتئین‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است. تیمار موش‌های ماده با آندروژن در دوره‌ی بحرانی جنینی و پس از تولد منجر به افزایش سطح بالای فعالیت TSPO تخمدان می‌شود و در نتیجه سیکل تولیدمثلی و رفتار تولیدمثلی جنس ماده را مختل می‌کند و باعث عدم تخمک‌گذاری می‌شود (۵). آندروژنه کردن موش‌های نوزاد ماده سبب تخریب نورون‌های آوران از سوی هسته‌ی پره اپتیک به هیپوفیز پیشین می‌شود که مسئول پاسخگویی به استروژن و ترشح سرژ GnRH/LH در قبل از تخمک‌گذاری هستند در نتیجه موش‌های آندروژنه به‌علت نداشتن ترشح سرژ LH، تخمک‌گذاری نخواهند داشت و نابارور خواهند بود (۲۹،۶). نشان داده شده است که افزایش در دسترس بودن تستوسترون در سیستم عصبی مرکزی به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق افزایش میزان دهیدرو تستوسترون سبب تنظیم افزایشی گیرنده‌های آندروژنی (گیرنده‌های ویژه تستوسترون) می‌شود و تعداد نورون‌های حاوی گیرنده آندروژن را افزایش می‌دهد. افزایش گیرنده‌های آندروژنی به‌نوبه خود محتوای نروترانسمیتری مغز موش ماده را تغییر داده و تمایز جنسی مغز را به سمت نر شدن می‌برد (۳۱). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند تمایز فولیکول‌ها به‌وسیله گنادوتروپین‌ها و استروئیدهای جنسی نظیر پروژسترون، تستسترون، استروژن تنظیم می‌شود (۲۷). نشان داده شده است که تیمار با استروژن سبب تکثیر سلول‌های گرانولوزای تخمدان شده و سطح آنزیم‌های کلیدی در استروئیدوژنز و حساسیت سلول‌های گرانولوزا به تحریک به‌وسیله FSH را بالا می‌برد (۱۸). تیمار با تستوسترون درجه فعالیت آنزیم آروماتاز (آنزیمی که آندروژنی نظیر تستسترون را به استروژن تبدیل می‌کند)(۹) و پاسخ‌دهی تخمدان به گنادوتروپین را بالا می‌برد (۲۷). آزمایش‌ها نشان داده‌اند که تیمار با تستوسترون، سطح استروژن سرم را افزایش می‌دهد. بنابراین، اثر تستسترون روی غلظت TSPO حداقل به‌طور ناقص به‌وسیله ساختن استروژن تخمدانی میانجی‌گری می‌شود (۹). از طرفی مشخص شده است که بیان mRNA کیس‌پپتین در ماده‌ها بیش‌تر از نرهاست. کیسپپتین بر نورون‌های GnRH که ترشح سرژ LH را کنترل می‌کنند اثرگذارند. مطالعات نشان می‌دهد که آندروژنه کردن در دوران نوزادی میزان بیان کیس‌پپتین را کاهش می‌دهد. بنابراین کاهش آن‌ها بر روی کاهش ترشح سرژ LH موثر است (۳۴).

هم‌چنین دراین تحقیـق میـزان بیـان ژن TSPO در تخمـدان موش‌های صحرایی بالغ آندروژنه دریافت‌کننده مقـادیر مختلـف گرلین نسبت به موش‌های صحرایی بالغ آندروژنه بررسـی شـد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر مختلف گـرلین بـه‌طـور معنی‌داری نسبت به گروه آندروژنه کاهش یافت. هر چند که در این تحقیق برای اولین بار اثرات گرلین بر بیان یکی از ژن‌هـای دخیل در استروئیدوژنز بررسی شد و نمی‌توان نتـایج حاصـل را با تحقیقات پیشین مقایسه کرد ولی می‌تـوان احتمـال دخالـت برخی از مکانیسم‌های عصبی مرکزی را در اثرات گرلین بر بیان TSPO مطرح نمود. تاکنون مشـخص شـده اسـت کـه گـرلین پپتیـدی ارکسـینرژیک بـا اثـر منفـی روی محـور تولیـدمثلی می‌باشد. در بالانس انرژی منفی گرلین باعث تـاخیر در فراینـد بلوغ و برهم زدن باروری می‌شـود. تزریـق گـرلین اگـزوژن نیـز اثرات مهاری بـر آزادسـازی هورمـون‌هـای GnRH و LH دارد (۱۴،۱۶). هرچند که اثرات تزریق گرلین بـر مسـیرهای عصـبی کنترل‌کننده استروئیدوژنز در موش‌های صحرایی آندروژنه نیـاز به تحقیق بیش‌تر دارد ولی احتمال دارد گـرلین اثـرات مهـاری خـود بـر بیـان TSPO را از طریـق افـزایش یـا کـاهش سـنتز پپتیدهای دخیل درمسیر تولیدمثل نظیر لپتین، کـیس‌پپتـین، نوروپپتید Y (NPY) و غیـره اعمـال کنـد. مشـخص

شده است که کیس‌پپتین (Kiss 1) و گیرنده G– پروتئینی آن (Kiss1r) یک نقش محوری در کنترل مرکزی محور HPG بازی می‌کند. به‌طوری که در گونه‌های مختلف جانوری و انسان جهش در ژن Kiss1r با تاخیر در بلوغ جنسی، هیپوگنادیسم و ناباروری همراه است. به‌علاوه نشان داده شده است که تزریق محیطی و مرکزی کیس‌پپتین ، ترشح LH و GnRHرا به‌طور قوی تحریک می‌کند (۴). هم‌چنین نشان داده شده است که گرلین از طریق کاهش فعالیت مسیر پیام‌رسانی کیس‌پپتین Kiss1r سبب مهار ترشح گنادوتروپین می‌شود (۱،۱۵). در نتیجه احتمال دارد گرلین از طریق برهم‌کنش با مسیر کیس‌پپتین و کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها اثرات کاهشی خود بر میزان بیان ژن TSPO را اعمال کرده باشد. هم‌چنین تحقیقات نشان داده است که لپتین به‌طور مستقیم، بر عملکرد تخمدان تاثیر دارد و گیرنده‌های لپتین در تخمدان انسان، موش، موش صحرایی و خوک بیان می‌شوند (۲۱،۷،۳۳،۲۰). علاوه براین مطالعات اثرات تحریکی و مستقیم لپتین، بر تخمدان انسان و موش صحرایی را نشان داده‌اند که تزریق آن موجب القای بیان سیتوکروم P۴۵۰ آروماتاز و به‌دنبال آن سنتز استروژن می‌شود (۲۲). تحقیقات Ruiz-Cortés و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که تزریق لپتین از طریق افزایش پروتئین star (پروتئین انتقال‌دهنده کلسترول از غشای داخلی میتوکندری در بافت‌های سازنده استروئیدها) باعث افزایش استروئیدوژنز می‌شود (۳۲). از آن‌جایی که به هنگام افزایش سنتز گرلین میزان سنتز لپتین کاهش می‌یابد (۱۱،۳۵)، این احتمال وجود دارد که کاهش لپتین به هنگام تزریق گرلین، یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی اثرات مهاری گرلین بر میزان بیان TSPO باشد. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که تزریق گرلین سبب افزایش بیان ژن‌های پپتید وابسته به آگوتی(AgRP) و NPY در هسته آرکوئت هیپوتالاموس می‌شود (۱۹). 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 سبب کاهش آزادسازی GnRH/LH می‌شوند این احتمال وجود دارد که گرلین از طریق افزایش NPY و AgRP و آزادسازی GABA و در نتیجه کاهش آزادسازی LH در کاهش بیان ژن TSPO نقش داشته باشد.

در کل یافته‌های تحقیق حاضر نشان دادند که آندروژنه کردن موش‌های صحرایی ماده در روز سوم تولد باعث افزایش بیان ژن TSPO در تخمدان نسبت به گروه شاهد می‌شود. هم‌چنین تزریق داخل بطن سوم مغزی پپتید گرلین به موش‌های صحرایی آندروژنه بیان ژن TSPO را در تخمدان در مقایسه با موش‌های صحرایی آندروژنه شده به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از همکاری سرکارخانم دکتر سمیعی از دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و آقای غفاری از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و سرکار خانم ملیحه سلیمی جهت همکاری صمیمانه‌شان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. **Ahmed, H.H.; Khalil, K.B.W.; Shousha, W.G.; El-Sayed, E.M.; Eskander, E.F. and Selim, R.E., 2010.** MolecularGenetic and Biochemical Evaluation of Ghrelin Hormone as a Novel signal of Gonadal Function in Adult male rats.JASMR. Vol. 5, No. 2, pp. 89-100.
2. **Akingbemi, B.T.; Braden, T.D.; Kemppainen, B.W.; Hancock, K.D.; Sherrill, J.D. and Cook, S.J., 2007.** Exposure to Phytoestrogens in the Perinatal Period Affects Androgen Secretion by Testicular Leydig Cells in the Adult Rat. Endocrinology. Vol. 148, No. 9, pp. 4475-88.
3. **Anholt, R.R.; Pedersen, P.L.; De Souza, E.B. and Snyder, S.H., 1986.** The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. Journal of Biological Chemistry. Vol. 261, No. 2, pp. 576-83.
4. **Arreguin-Arevalo, J.A.; Lents, C.A.; Farmerie, T.A.; Nett, T.M. and Clay, C.M., 2007.** KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. Animal reproduction science. Vol. 101, No. 3, pp. 265-75.
5. **Bar-Ami, S.; Amiri, Z.; Fares, F. and Gavish, M., 1994.** Modulation of peripheral benzodiazepine receptors in

6. **Barraclough, C.A., 1961.** Production of anovulatory sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinolog. 68: 62–7.
7. **Braestrup, C. and Squires, R.F., 1977.** Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 74, No. 9, pp. 3805-9.
8. **Burger, L.L.; Haisenleder, D.J. and Wotton, G.M., 2007.** 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 E277–85.
9. **Daniel, S. and Armstrong, D.T., 1984.** Site of Action of Androgens on Follicle-Stimulating Hormone-Induced Aromatase Activity in Cultured Rat Granulosa Cells. Endocrinology. Vol. 114, No. 6, pp. 1975-82.
10. **Duggal, P.S.; Van der Hoek, K.H.; Milner, C.R.; Ryan, N.K.; Armstrong, D.T. and Magoffin, D.A., 2000.** The in Vivo and in Vitro Effects of Exogenous Leptin on Ovulation in the Rat. Endocrinology. Vol. 141, No. 6, pp.1971-6.
11. **Dupont, J.; Maillard, V.; Coyral-Castel, S.; Rame´, C. and Froment, P., 2010.** Ghrelin in female and male reproduction. Int J Pept 158102.
12. **Eileen, M.; Melissa, A.M.; Maricedes, A.M.; Teresa, H.H. and Jon, E.L., 2008.** Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. HormBehav. Vol. 53, No. 5, pp. 673–692.
13. **Fares, F.; Bar-Ami, S.; Brandes, J.M. and Gavish, M., 1998.** Changes in the density of peripheral benzodiazepine binding sites in genital organs of the female rat during the oestrous cycle. Journal of Reproduction and Fertility. Endocrinology. Vol. 83, No. 2, pp. 619-25.
14. **Fernández-Fernández, R.; Tena-Sempere, M.; Navarro, V.M.; Barreiro, M.L.; Castellano, J.M. and Aguilar, E., 2005.** Effects of Ghrelin upon Gonadotropin-Releasing Hormone and Gonadotropin Secretion in Adult Female Rats: In vivo and in vitro Studies. Neuroendocrinology. Vol. 82, No. 5-6, pp. 245-55.
15. **Forbes, S.; Li, X.F.; Kinsey-Jones, J. and O'Byrne, K., 2009.** Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. Neuroscience Letters. pp: 143–147.
16. **Furuta, M.; Funabashi, T. and Kimura, F., 2001.** Intracerebroventricular Administration of Ghrelin Rapidly Suppresses Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Ovariectomized Rats. Biochemical and Biophysical Research Communications. Neuroendocrinology. Vol. 288, No. 4, pp. 780-5.
17. **Genissel, C. and Carreau, S., 2001.** Regulation of the aromatase gene expression in mature rat LeydigCells. Molecular and Cellular. Endocrinology. pp: 141–146.
18. **Goldenberg, R.L.; Vaitukaitis, J.L. and Ross, G.T., 1972.** Estrogen and folliclestimulating hormone interactions on follicle growth in rats. Endocrinology.90: 1492–1498.
19. **Kalra, S.P. and Horvath, T.L., 1998.** Neuroendocrine Interactions between Galanin, Opioids, and Neuropeptide Y in the Control of Reproduction and Appetite a. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 863. No. 1, pp. 236-40.
20. **Karlsson, C.; Lindell, K.; Svensson, E.; Bergh, C.; Lind, P. and Billig, H., 1977.** Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Vol. 82, No. 12, pp. 4144-8.
21. **Kikuchi, N.; Andoh, K.; Abe, Y.; Yamada, K.; Mizunuma, H. and Ibuki, Y., 2001.** Inhibitory Action of Leptin on Early Follicular Growth Differs in Immature and Adult Female Mice. Biology of Reproduction. Vol. 65, No. 1, pp. 66-71.
22. **Kitawaki, J.; Kusuki, I.; Koshiba, H.; Tsukamoto, K. and Honjo, H., 1999.** Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. Molecular Human Reproduction. Vol. 5, No. 8, pp. 708 13.
23. **Kluge, M.; Schussler, P.; Schmidt, S.; Uhr, M. and Steiger, M., 2012.** Ghrelin Suppresses Secretion of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Women. J Clin

Endocrin Metab. pp: 2011-2607.

24. **Kojima, M.; Hosada, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H. and Kangawa, K., 1999.** Ghrelin is a growthhormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. pp: 656–660.
25. **Korenbrot, C.C., 1975.** Effects of testosterone propionate or dihydrotestosterone propionate on plasma FSH and LH levels in neonatal rats and on sexual differentiation of the brain. Endocrinology. 97: 709–17.
26. **Kubo, K., 1975.** Similarity of plasma LH release in androgenized and normal rats following electrochemical stimulation of the basal forebrain. Endocrinology. 96: 492–500.
27. **Leung, P.C.K.; Goff, A.K. and Armstrong, D.T., 1979.** Stimulatory Action of Androgen Administration in Vivo on Ovarian Responsiveness to Gonadotropins. Endocrinology. Vol. 104, No. 4, pp. 1119-23.
28. **Muccioli, G.; Lorenzi, T.; Lorenzi, M.; Ghe, C.; Arnoletti, E.; MattaceRaso, G. and Castellucci, M., 2011.** Beyond the metabolic role of ghrelin: A new player in the regulation ofreproductive function. Peptides. pp: 2514–2521.
29. **Murakami, S. and Arai, Y., 1989.** Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal treatment Neuroscience Letters. Vol. 102, No. 2–3, pp. 185-90.
30. **Papadopoulos, V.; Amri, H.; Boujrad, N.; Cascio, C.; Culty, M. and Garnier, M., 1997.** Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. Steroids. Vol. 62, no. 1, pp. 21-8.
31. **RoselliCh, E. and Klosterman, S.A., 1998.** Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure.TheEndocrineSocietyt. 7: 3193–3201.
32. **Ruiz-Cortés, Z.T.; Martel-Kennes, Y.; Gévry, N.Y.; Downey, B.R.; Palin, M.F. and Murphy, B.D., 2003.** Biphasic Effects of Leptin in Porcine Granulosa Cells. Biology of Reproduction. Vol. 68, No. 3, pp. 789-96.
33. **Ruiz-Cortés, Z.T.; Men, T.; Palin, M.F.; Downey, B.R.; Lacroix, D.A. and Murphy, B.D., 2000.** Porcine leptin receptor: Molecular structure and expression in the ovary. Molecular Reproduction and Development. Vol. 56, No. 4, pp. 465-74.
34. **Smith, J.T., 2005.** Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology. 146: 3686–92.
35. **Thorsell, A.; Caberlotto, L.; Rimondini, R. and Heilig, M., 2002.** Leptin suppression of hypothalamic NPY expression and feeding, but not amygdala NPY expression and experimental anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior. Vol. 71, No. 3, pp. 425-30.
36. **Uilenbroek, J.T.J. and Richards, J.S., 1979.** Ovarian Follicular Development during the Rat Estrous Cycle: Gonadotropin Receptors and Follicular Responsiveness. Biology of Reproduction. Vol. 20, No. 5, pp. 1159-65.
37. **Zeleznik, A.J.; Hillier, S.G.; Knazek, R.A.; Ross, G.T. and Coon, H.G., 1979.** Production of Long Term Steroid-Producing Granulosa Cell Cultures by Cell Hybridization. Endocrinology. Vol. 105, No. 1, pp. 156-62.

Effects of central injection of Ghrelin on TSPO gene expression in the ovaries of rats (*Rattus norvegicus*) androgenized in Third day of birth

- **Ali khorasani*:** Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- **Reza fartoutzadeh:** Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- **Homayoon Khazali:** Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
- **Fariba mahmoudi:** Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: September 2013 Accepted: November 2013

Key words: Ghrelin, TSPO, Androgenized rats

Abstract

Ghrelin exerts inhibitory effects on gonadotropins secretion. The product of TSPO gene is mainly found on the outer mitochondrial membrane and it is a key protein in the steroidogenesis pathway. It transports cholesterol in to mitochondria of organs that synthesize steroids. 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 were investigated on the expression of TSPO gene in the ovaries of pubertal androgenized female rats.

Twenty neonatal female rats were androgenized on the third day after birth by subcutaneous injection of 50µg TP and five neonatal female rats in one group was considered as controls. After puberty, the animals in four groups (n=5 in each group) received central injections of saline or different doses of ghrelin(2, 4 or 8µg). Also, five non-androgenied rats as control group received central injection of saline. The ovaries were removed bilaterally and frozen. TSPO gene expression levels was determined by semi quantitative RT-PCR**.**

The mRNA levels of TSPO increased significantly in the ovaries of the androgenized rats compared to the controls. Ghrelin injections decreased significantly TSPO gene expression compared to the androgenized rats ($P < 0.05$).

Androgen may stimulate TSPO gene expression in the ovaries. Ghrelin may exert inhibitory effects on reproductive axis partly via reducing the expression of genes involved in the steroidogenesis.

* Corresponding Author's email: alikhorasani1987@gmail.com