

اثرات تزریق داخل بطن سوم مغزی گرلین بر بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی ماده آندروژنه

- زهرا عالی‌شاه‌ارات‌بنی: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ملیحه سلیمی‌بنی: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- همایون خزعلی*: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- فریبا محمودی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۵

چکیده

گرلین اثرات مهاری بر فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادها (HPG) اعمال می‌کند. آروماتاز آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز استروئیدهای جنسی است که تبدیل تستوسترون به استروژن را در مغز کاتالیز می‌کند. در این تحقیق اثرات تزریق گرلین بر میزان بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های ماده بالغ آندروژنه بررسی شد. بیست موش صحرایی ماده نژاد ویستار ۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپونات را با تزریق زیر پوستی، در روز سوم تولد دریافت کردند. حیوانات بالغ آندروژنه به ترتیب سالی، مقادیر ۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین را از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. یک گروه شاهد غیر آندروژنه، در بلوغ سالی دریافت کردند. بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموس با استفاده از روش PCR نیمه کمی تعیین گردید. میزان بیان نسبی ژن آروماتاز در گروه شاهد آندروژنه نسبت به غیر آندروژنه به طور معنی‌داری افزایش یافت. گرلین میزان بیان نسبی ژن آروماتاز را در مقایسه با گروه شاهد آندروژنه به طور معنی‌داری کاهش داد. گرلین ممکن است اثرات مهاری بر بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز اعمال کند.

کلمات کلیدی: گرلین، آروماتاز هیپوتالاموسی، آندروژنه



مقدمه

فرایند تولیدمثل تحت کنترل مرکزی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادها (HPG) است. این محور در هیپوتالاموس در هسته قوسی (ARC) و ناحیه پری اپتیک میانی (mPOA) تحت تاثیر فاکتورهای متعدد قرار می‌گیرد. نوروترانسمیترها، نوروپپتیدها و هورمون‌های متعددی در هیپوتالاموس با این مسیر هم‌پوشانی دارند و بر روی این محور تاثیرگذار هستند (Constantin, 2011; Maeda و همکاران, 2010). گرلین پپتید ۲۸ آمینو اسیدی است که به‌طور عمده در معده و هسته‌های هیپوتالاموسی به‌ویژه هسته ARC سنتز می‌شود و در تنظیم عملکردهای تولیدمثلی و سرکوب فعالیت محور HPG نقش اساسی دارد. نشان داده شده است که تزریق گرلین به‌طور محیطی یا مرکزی سبب مهار آزادسازی GnRH/LH و ترشح هورمون‌های استروئیدی جنسی می‌شود (García و همکاران, 2007; Fernández-Fernández و همکاران, 2004). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که mRNA گیرنده GHS-R1a که گیرنده گرلین است علاوه بر مغز در تخمدان و بیضه بیان می‌شود که این یافته نشان‌دهنده اثرات گرلین در کنترل عملکرد بیضه و تخمدان می‌باشد (Caminos و همکاران, 2003; Tena-Sempere و همکاران, 2002).

آنزیم سیتوکروم P450 آروماتاز (سیتوکروم P450arom یا آنزیم Cyp19) یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است که توسط ژن Cyp19 در بیضه‌ها و دستگاه عصبی مرکزی به‌ویژه هیپوتالاموس کد می‌شود و سبب کاتالیز تبدیل آندروژن‌ها از جمله تستوسترون به استرادیول در مغز و بافت‌های محیطی می‌گردد (Roselli, 2007; Carreau و همکاران, 2002). آروماتاز هیپوتالاموسی از طریق تنظیم سطوح استروژن‌ها عملکرد اساسی در تنظیم آزادسازی GnRH، گنادوتروپین‌ها و تمایز رفتار جنسی موش‌های صحرائی دارد. به‌طوری‌که شکل‌گیری رفتار جنسی در موش‌های صحرائی به‌واسطه قرار گرفتن در معرض آندروژن، در دوره بحرانی جنینی شروع شده و تا ۱۰ روز بعد از تولد ادامه می‌یابد (Roselli, 2007; Roselli و همکاران, 1998; Roselli و Resko, 1997; Lephart, 1996). مطالعات نشان داده است که تیمار موش‌های ماده با آندروژن در دوره بحرانی جنینی و پس از تولد منجر به افزایش سطح فعالیت آروماتاز هیپوتالاموس شده و در نتیجه سیکل تولیدمثلی و رفتار تولیدمثلی جنس ماده را مختل کرده و باعث عدم تخمک‌گذاری می‌شود (Roselli و همکاران, 2007; Roselli, 1998). هم‌چنین ثابت شده است که آروماتیزاسیون تستوسترون در هیپوتالاموس برای کنترل فیدبک منفی ترشح LH ضروری است (Roselli, 2007). مطالعه در موش‌های صحرائی نر نشان می‌دهد که گرلین ترشح آندروژن‌ها نظیر تستوسترون

را به‌واسطه کاهش بیان mRNA فاکتورهای موثر در مسیر استروئیدوژنز (نظیر سیتوکروم P450) کاهش می‌دهد. هم‌چنین نشان داده شده است که گرلین علاوه بر کاهش سطح و میزان بیان LH، بیان Cyp19 را نیز در هیپوتالاموس موش‌های صحرائی نر کاهش می‌دهد (Hanaa و همکاران, 2010). با توجه به این حقیقت که تنظیم سطوح بیان mRNA آروماتاز در هیپوتالاموس یکی از فاکتورهای بسیار مهم در تنظیم فرایند تولیدمثلی و رفتارهای جنسی در گونه‌های مختلف جانوری است و تاکنون گزارشی درباره اثرات گرلین بر میزان بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز در حیوانات آندروژنه ماده وجود ندارد هدف از این مطالعه بررسی اثرات تزریق داخل بطن سوم مغزی گرلین بر میزان بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های ماده بالغ آندروژنه است تا مشخص شود که پپتیدهای مهارکننده آزادسازی GnRH/LH احتمال دارد در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز نقش داشته باشند.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشی: ۲۵ موش صحرائی ماده نژاد ویستار تازه متولد شده از محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی، دانشکده علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شد. در سومین روز بعد از تولد ۲۰ نوزاد ماده به‌صورت تصادفی به‌منظور آندروژنه کردن موش‌های صحرائی ۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپیونات در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روغن زیتون را به‌صورت زیر پوستی دریافت کردند (Rezaei و همکاران, 2014; Arai و Murakami, 1989) و ۵ نوزاد (گروه شاهد غیر آندروژنه) تنها ۱۰۰ میکرولیتر روغن زیتون دریافت کردند. نوزادان به قفس مادر منتقل شده و از شیر مادر تغذیه کردند. سپس حیوانات از مادر جدا و به‌صورت تصادفی به گروه‌های ۵ تایی تقسیم 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.

مرحله کانول گذاری: بعد از بلوغ موش‌های صحرائی ماده آندروژنه در محدوده وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلین (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. کانول ساخته شده از سرسرنگ تزریقی ۲۲ gauge با استفاده از دستگاه استرنوتاکسیک و با کمک سه عدد پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی در سطح جمجمه تثبیت شد. براساس اطلس واتسون و پاکسینوس نوک کانول در مختصات بطن سوم ($AP=2/3, ML=0, DV=6/5$) قرار گرفت (Mahmoudi و همکاران, 2014). حیوانات بعد از جراحی

دستورالعمل کیت PCR (vivantis, Malaysia) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) ازدیاد ژنی شدند. توالی‌های الیگو نوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی-سنس β -اکتین و آروماتاز در جدول ۱ ذکر شده است (Rezaei و همکاران، ۲۰۱۴). محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ آمیزی safe view نمایان شده و توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شدند.

جدول ۱: ترادف و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت واکنش PCR

ژن	پرایمر	ترادف	دمای آنیلینگ	طول قطعه حاصل (جفت باز)
آروماتاز	سنس	5'-GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-3'	۶۱°C	۲۸۹
	آنتی سنس	5'-CAAGGGTAAATTCATTTGGGCTTGG-3'		
β -اکتین	سنس	5'-GAAATCGTGGTGACATTAAG-3'	۵۸°C	۵۱۱
	آنتی سنس	5'-GCTAGAAGCATTTCGGTGGGA-3'		

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل به صورت میانگین \pm SEM

ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T-test جفت نشده، آزمون ANOVA یک طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده نتایج با $P < 0.05$ معنی‌دار گزارش شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که تزریق تستوسترون پروپیونات در روز سوم بعد از تولد سبب افزایش فراوانی سطح mRNA آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه نسبت به موش‌های صحرایی شاهد (غیر آندروژنه) گردید (شکل ۱A). سطح mRNA β -اکتین (که به عنوان شاهد داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه و موش‌های صحرایی شاهد مشاهده شد (شکل ۱A). آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به دست آمده از پنج موش صحرایی در هر گروه) نشان داد که میزان بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه در مقایسه با گروه شاهد غیر آندروژنه به میزان ۱/۱۹ برابر افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (شکل ۱B). نتایج حاصل نشان داد که فراوانی سطح mRNA آروماتاز، در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر ۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین نسبت به گروه شاهد آندروژنه کاهش یافت (شکل ۲A). سطح mRNA β -اکتین به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی گروه شاهد آندروژنه و موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر مختلف گرلین مشاهده شد (شکل ۲A).

به قفس‌های انفرادی برگردانده شدند و به آن‌ها یک هفته اجازه بهبودی داده شد. بعد از یک هفته دوره بهبودی ۲۰ موش صحرایی آندروژنه در چهار گروه به ترتیب سالی، مقادیر ۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین را در حجم سه 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 از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. پنج موش صحرایی نیز در یک گروه به عنوان گروه شاهد سالم تزریق داخل بطن سوم سه میکرولیتر سالی را دریافت کردند. تستوسترون پروپیونات (Sigma, USA) در روغن زیتون و گرلین (Anaspec, USA) در سالی حل شدند. دو ساعت بعد از تزریق با بی‌هوش کردن حیوانات نمونه‌های هیپوتالاموسی جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

مرحله استخراج RNA: نمونه‌های هیپوتالاموسی با استفاده از

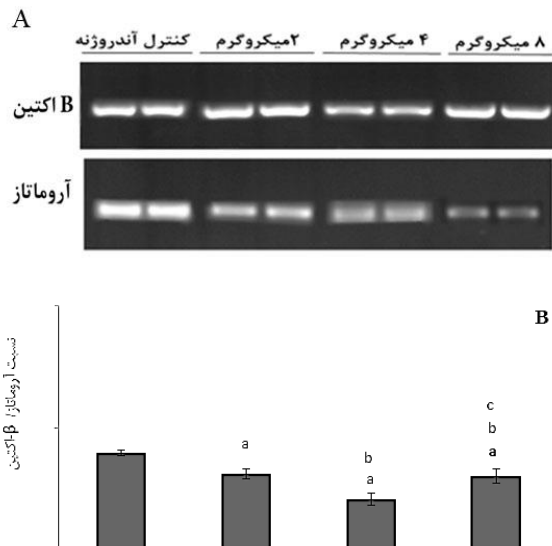
pureZol و دستگاه هموژنایزر هموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها بر اساس روش فنل کلروفرم و با استفاده از pureZole، کلروفرم، اپزو پروپانول و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت (Bio Rad, USA) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (تهیه شده از شرکت سیناژن) حل شد و تا زمان سنتز cDNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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 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 زنجیره‌ای پلی‌مراز ترانس

کریپتاز معکوس (RT-PCR): cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ میکروگرم RNA مطلق، پرایمر پلی‌تیمین، آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (vivantis, Malaysia) بر طبق دستورالعمل کیت توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد. از آن‌جا که β -اکتین به‌طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله مغز 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 شامل دو میکرولیتر نمونه cDNA، پنج میکرولیتر بافر PCR10X، یک و نیم میکرولیتر MgCl_2 ۵۰، یک میکرولیتر 10 mM dNTP ، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای سنس و آنتی-سنس ۱۰ میکرومولار، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمرز Taq (۱، ۲۵ U)، آب استریل (۳۸/۲۵ میکرولیتر) بر حسب



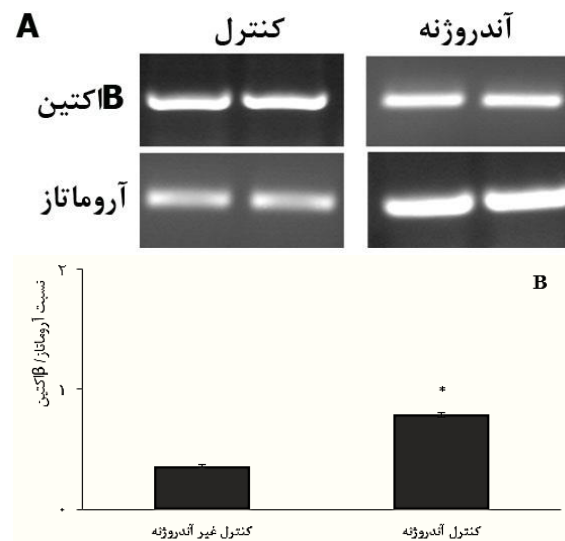
(شکل ۲B). همان‌طور که در شکل ۲B ملاحظه می‌شود سطح mRNA آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی دریافت‌کننده ۴ میکروگرم گرلین نسبت به ۲ یا ۸ میکروگرم گرلین از نظر آماری به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است ($P < 0.05$) (شکل ۲B).



شکل ۲: میانگین بیان نسبی ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی ماده آندروژنه تیمار شده با مقادیر مختلف گرلین در مقایسه با گروه شاهد آندروژنه (در هر گروه $n=5$, $P < 0.05$ معنی‌دار گزارش شده است). قسمت A؛ الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β -اکتین و آروماتاز از دیاد شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B؛ میانگین سطح mRNA آروماتاز در هر گروه را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA از دیاد شده از mRNA β -اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است. a: نسبت به شاهد آندروژنه، b: نسبت به ۲ میکروگرم، c: نسبت به ۴ میکروگرم.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق زیرپوستی تستوسترون در روز سوم بعد از تولد میانگین بیان نسبی ژن آروماتاز را نسبت به گروه شاهد غیرآندروژنه در دوران بلوغ به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. نتایج تحقیقات حاضر منطبق بر یافته‌های پیشین است که گزارش کردند که آندروژن‌ها نقش اساسی در بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموسی ایفا می‌کنند و در موش‌های صحرایی ماده آندروژنه شده در دوران جنینی یا پس از تولد بیان ژن آروماتاز افزایش چشمگیر نشان می‌دهد (Rezaei و همکاران، ۲۰۱۴؛ Lephart، ۱۹۹۶؛ Maurer، ۱۹۷۴). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند که آندروژن‌ها اثر پیام‌رسانی و سازماندهی بر روی سیستم عصبی دارند و در تمایز



شکل ۱: میانگین بیان نسبی ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی ماده آندروژنه در مقایسه با گروه شاهد غیر آندروژنه (در هر گروه $n=5$, $P < 0.05$ معنی‌دار گزارش شده است). قسمت A؛ الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β -اکتین و آروماتاز از دیاد شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B؛ میانگین سطح mRNA آروماتاز در هر گروه را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA از دیاد شده از mRNA β -اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است.

آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به‌دست آمده از پنج موش صحرایی در هر گروه) نشان داد که سطح mRNA آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی دریافت‌کننده مقادیر ۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین نسبت به گروه شاهد آندروژنه به‌ترتیب به‌میزان ۰/۲۲، ۰/۴۸، یا ۰/۲۴ برابر کاهش یافت که این میزان کاهش بیان آروماتاز در هر سه گروه نسبت به گروه شاهد آندروژنه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (شکل ۲B).

هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده ۴ میکروگرم گرلین در مقایسه با ۲ میکروگرم گرلین به‌میزان ۰/۳۸ برابر کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$) (شکل ۲B). میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه تیمار شده با مقدار ۸ میکروگرم گرلین در مقایسه با ۲ میکروگرم گرلین به‌میزان ۱۰ درصد کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست (شکل ۲B). میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی ماده آندروژنه تیمار شده با مقدار ۸ میکروگرم گرلین در مقایسه با ۴ میکروگرم گرلین به‌میزان ۰/۳۲ برابر افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$)

در هیپوتالاموس شده و به واسطه مکانیسم گیرنده-آندروژن بیان ژن آروماتاز در دوران بلوغ افزایش یافته است (Lephart, ۱۹۹۶).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق درون بطنی مغزی هر سه مقادیر ۲، ۴ یا ۸ میکروگرم گرلین، بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموس را به طور معنی داری نسبت به گروه آندروژنه کاهش داد. نتایج حاصل از این تحقیق منطبق بر نتایج اثرات مهاری گرلین بر بیان ژن آروماتاز در تخمدان یا سلول‌های چربی است (Docanto و همکاران، ۲۰۱۴؛ Rezaei و همکاران، ۲۰۱۴). هر چند که در این تحقیق برای اولین بار اثرات گرلین بر بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموس در موش‌های صحرایی آندروژنه ماده بررسی شد ولی می‌توان احتمال دخالت برخی از مکانیسم‌های عصبی مرکزی را در اعمال اثرات مهاری گرلین بر بیان آروماتاز مطرح کرد. در چند سال اخیر، گرلین به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های اعمال تولیدمثلی به‌ویژه در پستانداران شناخته شده است. مطالعات نشان داده است که نورون‌های گرلین با اثر بر سطوح مختلف مغزی نظیر هیپوتالاموس و هیپوفیز نقش خود را در تنظیم و تعدیل اعمال تولیدمثلی ایفا می‌کند (García و همکاران، ۲۰۰۷؛ Fernández-Fernández و همکاران، ۲۰۰۴؛ Sabina و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعه در موش‌های صحرایی نر نشان داد که گرلین ترشح آندروژن‌ها نظیر تستوسترون را به واسطه کاهش بیان mRNA فاکتورهای موثر در مسیر استروئیدوژنز (نظیر سیتوکروم P450) کاهش می‌دهد. محققان با مطالعه موش‌های صحرایی نر تحت محدودیت غذایی نشان دادند که در این حیوانات علاوه بر افزایش میزان بیان گرلین هیپوتالاموس، میزان بیان ژن LH، بیان ژن آروماتاز (CYP19) و Kiss1 نیز در هیپوتالاموس کاهش می‌یابد (Hanaa و همکاران، ۲۰۱۰). هر چند که اثرات تزریق گرلین بر مسیرهای عصبی کنترل‌کننده استروئیدوژنز در موش‌های صحرایی آندروژنه نیاز به تحقیق و بررسی بیش‌تر دارد ولی احتمال دارد گرلین اثرات مهاری خود بر بیان آروماتاز را از طریق افزایش یا کاهش سنتز پپتیدهای دخیل در مسیر تولیدمثل نظیر لپتین، کیس‌پپتین و غیره اعمال کند. کیس‌پپتین نوروپپتیدی است که در هسته قوسی (ARC) و پری‌ونتریکلار شکمی قدامی (AVPV) هیپوتالاموس سنتز می‌شود و یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های تحریکی محور HPG محسوب می‌شود (Thompson و همکاران، ۲۰۰۴). یافته‌های پیشین نشان داده است که گرسنگی که با افزایش ترشح گرلین همراه است یا تزریق گرلین با اثر بر بیان کیس‌پپتین روی محور HPG می‌گذارد و به واسطه تنظیم کاهشی مسیر کیس‌پپتین آزادسازی GnRH/LH را مهار می‌کند (Forbes و همکاران، ۲۰۰۹؛ Wahab و همکاران، ۲۰۰۸). هم‌چنین نشان داده شده است که هیپرگرلینمیا در موش‌های صحرایی نر سبب کاهش بیان ژن‌های کیس‌پپتین، LH-LH و آروماتاز می‌گردد (Hanaa و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین احتمال

جنسی ساختار و عملکرد مغز نقش مهمی ایفا می‌کنند. به طوری که قرار گرفتن در معرض هورمون تستوسترون در دوران جنینی یا در اوایل دوران پس از زایمان برای فرایند تمایز جنسی ضروری است. مطالعات گذشته در جوندگان ثابت کرده است که آندروژن‌ها بیان گیرنده آندروژنی (AR) در ناحیه پری‌اوپتیک و هسته بستر استریا ترمینالیس را در هر دو جنس نر و ماده تنظیم می‌کند. دریافت تستوسترون در روزهای یک‌الی پنج پس از تولد، تعداد گیرنده‌های AR و استروژنی (ER) را افزایش می‌دهد و هم‌چنین بر روی عملکرد آنزیم آروماتاز اثر می‌گذارد (Foecking و همکاران، ۲۰۰۸). به خوبی ثابت شده است که آروماتاز سیتوکروم P450 یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است. آروماتاز هیپوتالاموسی عملکرد اساسی در ترشح هورمون‌های گنادوتروپین و تمایز رفتار جنسی موش‌های صحرایی دارد. با توجه به نقش آندروژن‌ها در شکل‌گیری تمایز جنسی مغز مطالعات زیادی در جهت بررسی عملکرد آندروژن‌ها در هیپوتالاموس صورت گرفت است. Roselli و Resko (۱۹۹۷) نشان دادند که تیمار موش‌های ماده با آندروژن در دوره جنینی و پس از تولد منجر به افزایش سطح بالای فعالیت آروماتاز در هیپوتالاموس می‌شود و سیکل تولیدمثلی جنس ماده را مختل می‌کند و منجر به عدم تخم‌گذاری می‌شود (Carreau و Levallet، ۲۰۰۱؛ Roselli و Resko، ۱۹۹۷). هم‌چنین مطالعات گذشته نشان داده است که افزایش در دسترس بودن تستوسترون در سیستم عصبی مرکزی به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق افزایش میزان دی‌هیدرو تستوسترون سبب تنظیم افزایشی گیرنده‌های آندروژنی (گیرنده‌های ویژه تستوسترون) می‌شود. افزایش گیرنده‌های آندروژنی به نوبه خود محتوی نوروترانسمیتری مغز موش ماده را تغییر داده و تمایز جنسی مغز را به سمت نر شدن پیش می‌برد (Roselli و Klosterman، ۱۹۹۸). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند که آندروژن‌ها (تستوسترون) از طریق مکانیسم گیرنده-آندروژن باعث تحریک بیان ژن آروماتاز می‌شوند (Lephart، ۱۹۹۶). تفاوت بیان آروماتاز در جنس نر و ماده به دلیل پاسخ‌گویی متفاوت به تستوسترون است. علاوه بر آن مغز جنس نر غلظت بیش‌تری از تستوسترون را نسبت به جنس ماده دریافت می‌کند. بنابراین احتمال دارد تیمار جنس ماده با تستوسترون در دوران نوزادی منجر به افزایش گیرنده آندروژن در نورون‌های مغز ماده شده باشد. افزایش تعداد گیرنده‌های AR در هیپوتالاموس موش‌های ماده منجر به افزایش پاسخ دهی هیپوتالاموس به آندروژن‌ها می‌شود. با توجه به این‌که آندروژن‌ها از طریق مکانیسم گیرنده-آندروژن بیان ژن آروماتاز را تنظیم می‌کنند، احتمالاً تزریق تستوسترون در سومین روز بعد از تولد منجر به افزایش برگشت‌ناپذیر گیرنده‌های آندروژن



- secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters*. Vol. 362, No. 2, pp:103-107.
۸. **Foecking, E.; McDevitt, M.A.; Acosta-Martínez, M.; Horton, T.H. and Levine, J.E., 2008.** Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. *Hormones and Behavior*. Vol. 53, No. 5, pp: 673-692.
 ۹. **Forbes, S.; Li, X.F.; Kinsey-Jones, J. and O'Byrne, K., ۲۰۰۹.** Effects of ghrelin on kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neuroscience Letters*. Vol.460, No. 2, pp: 143-147.
 ۱۰. **García, M.C.; López, M.; Alvarez, C.V.; Casanueva, F.; Tena-Sempere, M. and Diéguez, C., 2007.** Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*. Vol.133, No. 3, pp: 531-540.
 ۱۱. **Hanaa, A.; Wagdy, K.; Shousha, W.; Sayed, El.; Emad, E. and Rehab, S., 2010.** Molecular genetic and biochemical evaluation of ghrelin hormone as a novel signal of gonadal function in adult male rats. *Journal of ab Society for Medical Research*. Vol. 5, No. 2, pp: 89-100.
 ۱۲. **Lephart, E.D., 1996.** A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Review*. Vol. 22, No. 1, pp:1-26.
 ۱۳. **Levallet, J. and Carreau, S., 2001.** Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. *Journal of Endocrinology*. Vol. 168, No. 1, pp: 95-105.
 ۱۴. **Maeda, K.; Ohkura, S., 2010.** Neurobiological mechanisms underlying GnRH Pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research*. Vol. 1364, pp: 103-115.
 ۱۵. **Magoffin, D.A.; Weitsman, S.R.; Aagarwal, S.K. and Jakimiuk, A.J., 1999.** Leptin regulation of aromatase activity in adipose stromal cells from regularly cycling women. *Ginekologia Polska*. Vol. 70, No. 1, pp: 1-7.
 ۱۶. **Mahmoudi, F.; Khazali, H. and Janahmadi, M., 2014.** Interactions of morphine and peptide 234 on mean plasma testosterone concentration. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*. Vol. 12, No. 1, pp:1-5.
 ۱۷. **Maurer, R.A., 1974.** Estradiol binding macromolecules in the hypothalamus and anterior pituitary of normal female, androgenized female, and male rats. *Brain Research*. Vol. 67, No. 1, pp: 175-177.
 ۱۸. **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 androgen treatment. *Neuroscience Letters*. Vol. 102, No. 2-3, pp: 185-190.
 ۱۹. **Rezaei, M.; Maghsoudi, A.; Khazali, H. and Mahmoudi, F., 2014.** Effects of ghrelin and orexin A on aromatase gene expression in the ovaries of female rats androgenized in third day of birth. *Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 17, No. 4, pp: 359-336.
 ۲۰. **Roselli, C.E. and Resko, J.A., 1997.** Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 6, No. 3-6, pp: 365-374.
 ۲۱. **Roselli, C.E. and Klosterman, S.A., 1998.** Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*. Vol. 139, No. 7, pp: 3193-3201.
 ۲۲. **Roselli, C.E.; Abdelgadir, S.E.; Rønnekleiv, O.K. and Klosterman, S.A., 1998.** Anatomic distribution and regulation of aromatase gene expression in the rat brain. *Biology of Reproduction*. Vol. 58, No. 1, pp: 79-87.
 ۲۳. **Roselli, C.E., 2007.** Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 106, No. 1-5, pp:143-150.
 ۲۴. **Tena-Sempere, M.; Barreiro, M.L.; González, L.C.; Gaytán, F.; Zhang, F.P.; Caminos, J.E.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F.; Diéguez, C. and Aguilar, E., 2002.** Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. Vol. 143, No. 2, pp: 717-725.
 ۲۵. **Thompson, E.L.; Patterson, M.; Murnhv. K.G.; Smith, K.T.; Dhillon, W.S.; Todd, J.F.; Ghatei, M.A. and Bloom, S.R., 2004.** Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Neuroendocrinology*. Vol. 16, No. 10, pp: 850-858.
 ۲۶. **Wahab, F.; Aziz, F.; Irfan, S.; Zaman, W.U. and Shahab, M., 2008.** Short-term fasting attenuates the response of the HPG axis to kisspeptin challenge in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Life Science*. Vol. 83, No.19-20, pp: 633-637.
 ۲۷. **Watanobe, H., 2002.** Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *Journal of Physiology*. Vol. 545, No. 1, pp: 255-268.
- دارد گرلین به‌واسطه کاهش کیس‌پپتین اثر کاهشی خود بر میزان بیان ژن آروماتاز را اعمال کند. علاوه بر آن ثابت شده است که لپتین پپتیدی است که در هنگام سیری و تعادل مثبت انرژی از بافت چربی ترشح می‌شود (Barash و همکاران، ۱۹۹۶). علاوه بر آن نشان داده شده است که لپتین یکی از هورمون‌های تحریکی بر فعالیت تولیدمثلی بوده و تزریق آن سبب افزایش ترشح هورمون‌های جنسی، GnRH و میزان بیان آروماتاز می‌گردد (Watanobe، ۲۰۰۲؛ Magoffin و همکاران، ۱۹۹۹) از آن‌جا که به‌هنگام افزایش سنتر گرلین میزان سنتر لپتین کاهش می‌یابد (Hanaa و همکاران، ۲۰۱۰؛ Barazzoni و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین کاهش لپتین به‌هنگام تزریق گرلین یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات مهارى گرلین بر میزان بیان آروماتاز است. به‌طور خلاصه، یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که آندروژنه کردن موش‌های صحرایی ماده در روز سوم بعد از تولد باعث افزایش بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس نسبت به موش‌های صحرایی ماده غیر آندروژنه می‌شود و گرلین موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه شهید بهشتی به‌دلیل حمایت مالی این پروژه و از همکاری سرکار خانم دکتر سمیعی از دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و جناب آقای غفاری از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. **Barash, I.A.; Cheung, C.C.; Weigle, D.S.; Ren, H.; Kabigting, E.B.; Kuijper, J.L.; Clifton, D.K. and Steiner, R.A., 1996.** Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. Vol. 137, No. 7, pp: 3144-3147.
۲. **Barazzoni, R.; Zanetti, M.; Stebel, M.; Biolo, G.; Cattin, L. and Guarneri, G., 2003.** Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *astroenterology*. Vol. 124, No. 5, pp:1188-1192.
۳. **Caminos, J.E.; Tena-Sempere, M.; Gaytán, F.; Sanchez Criado, J.E.; Barreiro, M.L.; Nogueiras, R.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E. and Diéguez, C., 2003.** Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. Vol. 144, No. 4, pp: 1594-1602.
۴. **Carreau, S.; Bourguiba, S.; Lambard, S.; Galeraud, I.; Genissel, Ch. and Levallet, J., 2002.** Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 193, No. 1, pp: 137-143.
۵. **Constantin, S., 2011.** Physiology of the GnRH neuron: Studies from embryonic GnRH neurons. *Journal of Neuroendocrinology*. Vol. 23, No. 6, pp: 542-553.
۶. **Docanto, M.M.; Yang, F.; Callaghan, B.; Au, C.C.; Ragavan, R.; Wang, X.; Furness, J.B., Andrews, Z.B. and Brown, K.A., 2014.** Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit aromatase expression and activity in human adipose stromal cells: suppression of cAMP as a possible mechanism. *Breast Cancer Research and Treatment*. Vol. 147, No. 1, pp: 193-201.
۷. **Fernández-Fernández, R.; Tena-Sempere, M.; Aguilar, E. and Pinilla, L., 2004.** Ghrelin effects on gonadotropin