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

- **زهرا عالیشاه‌ارات‌بنی:** دانشکده علوم زیستي، دانشگاه شهید بهشتي، تهران، ایران
- **ملیحه سلیمی‌بنی:** دانشکده علوم زیستي، دانشگاه شهید بهشتي، تهران، ایران
- **همایون خزعلی*:** دانشکده علوم زیستي، دانشگاه شهید بهشتي، تهران، ایران
- **فریبا محمودی:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: تیر 1395 تاریخ پذیرش: مهر 1395

چکیده

گرلین اثرات مهاری بر فعالیت محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ 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 50 میکروگرم تستوسترون پروپیونات را با تزریق زیر پوستی، در روز سوم تولد دریافت کردند. حیوانات بالغ آندروژنه به ترتیب سالین، مقادیر 2، 4 یا 8 میکروگرم گرلین را از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. یک گروه شاهد غیر آندروژنه، در بلوغ سالین دریافت کردند. بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموس با استفاده از روشPCR نیمه‌کمی تعیین گردید. میزان بیان نسبی ژن آروماتاز در گروه شاهد آندروژنه نسبت به غیر آندروژنه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. گرلین میزان بیان نسبی ژن آروماتاز را در مقایسه با گروه شاهد آندروژنه به‌طور معنی داری 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 28 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 می‌دهدکه 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 $P450_{arom}$ 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 کدمی‌شودو سبب کاتالیز تبدیل آندروژن‌ها ازجمله 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 صحرایی دارد. به‌طوری‌که شکل‌گیری رفتار جنسی در موش‌های صحرایی به‌واسطه قرار گرفتن در معرض آندروژن، در دوره بحرانی جنینی شروع شده و تا 10 روز بعد از تولد ادامه می‌یابد (Roselli،

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: homayoun_Khazali@yahoo.com

2007؛ Roselli و همکاران، 1998؛ Roselli و Resko، 1997؛ Lephar، 1996). مطالعات نشان‌داده 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 جنس‌ماده 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 ترشحLH ضروری است (Roselli، 2007). مطالعه در موش‌های صحرایی نر نشان می‌دهد که گرلین ترشح آندروژن‌ها نظیر تستوسترون رابه‌واسطه‌کاهش‌بیان 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، بیانCyp19 را نیز در هیپوتالاموس موش‌هایی صحرایی 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 احتمال‌دارددر تنظیم بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز نقش داشته باشند.

مواد و روش‌ها

حیوانات‌آزمایشی: 25 موش صحرایی ماده نژاد ویستار تازه متولدشده‌از محل‌پرورش حیوانات آزمایشگاهی، دانشکده علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شد. درسومین روز بعد از تولد 20 نوزاد ماده به‌صورت تصادفی به‌منظور آندروژنه کردن موش‌های صحرایی 50 میکروگرم تستوسترون‌پروپیونات‌در حجم 100 میکرولیتر روغن زیتون را به‌صورت زیر پوستی دریافت کردند (Rezaei و همکاران، 2014؛ Murakami و Arai، 1989) و 5 نوزاد (گروه شاهد غیرآندروژنه) تنها 100 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 5 تایی تقسیم شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دماي 2±22 و چرخه 12 ساعت روشنايي/ تاريكي با شروع روشنايي در ساعت 7 صبح) نگه‌داري شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

مرحله کانول‌گذاری: بعد از بلوغ موش‌های صحرایی ماده آندروژنه در محدوده وزنی 220-180 گرم با تزریق داخل صفاقی مخلوطي از کتامین (80 میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلسین (10 میلی‌گرم به‌ازای هر کیلو گرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. کانول ساخته شده‌از سرسرنگ‌تزريقي gauge 22با استفاده از دستگاه استرئوتاکسيك و با كمك سه عدد پيچ عينك و سيمان دندانپزشكي در سطح جمجمه تثبيت شد. براساس اطلس واتسون و پاکسینوس نوك كانول در مختصات بطن سوم (AP=2/3،ML=0/0،DV=6/5) قرار گرفت (Mahmoudi و همکاران، 2014). حيوانات بعد از جراحي به قفس‌هاي انفرادي برگردانده شدند و به آن‌ها يك هفته اجازه بهبودي داده شد. بعد از یک هفته دوره بهبودی 20 موش صحرایی آندروژنه در چهار گروه به‌ترتیب سالین، مقادیر 2، 4 یا 8 میکروگرم گرلین را در حجم سه میکرولیتر با استفاده از سرسرنگ دندانپزشكي gauge 27 که از طریق لوله رابط پلي اتيلني به سرنگ هاميلتون 5 میکرولیتر وصل شده بود در ساعت 10- 9 صبح از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. پنج موش صحرایی نیز در یک گروه به‌عنوان گروه شاهد سالم تزریق داخل بطن سوم سه میکرولیتر سالین را دریافت کردند. تستوسترون پروپیونات (Sigma, USA) در روغن زیتون و گرلین (Anaspec, USA) در سالین حل شدند. دو ساعت بعد از تزریق با بی‌هوش کردن حیوانات نمونه‌های هیپوتالاموسی جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای 80-درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگه‌داری شدند.

مرحله استخراج RNA: نمونه های هیپوتالاموسی با استفاده از pureZol و دستگاه هموژنایزر هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها بر اساس روش فنل کلروفرم و با استفاده از pureZole، کلروفرم، ایزو پروپانول و اتانول 75% 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 20- درجه سانتی‌گرادنگه‌داری گردید. غلظت RNA با خواندن میزان جذب RNA در260 نانومتر تعیین شد. همچنین، میزان خلوص RNA با خواندن میزان‌جذب در280نانومتر و براساس‌نسبت‌جذبA260/A280 محاسبه گردید. این نسبت برای‌نمونه‌های خالص RNA برابر 2±0/15 می‌باشد.

مرحله سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ترانس کریپتاز معکوس (RT- PCR): cDNA تک رشته‌ای با استفاده از 5 میکروگرم RNA مطلق، پرایمر پلی‌تیمین، آنزیم DNAپلی‌مراز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (vivantis, Malaysia) برطبق دستورالعمل کیت توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد. از آن‌جاکه β- اکتین به‌طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله مغز سنتز می‌شود. تعیین سطح mRNA آن توسط روشRT- PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA آروماتاز استفاده شد. برای انجام PCR، نمونه‌های cDNA برای 35 چرخه (94C ° برای 2دقیقه، 94°C برای 30 ثانیه، °C 61 برای 30 ثانیه،72°Cبرای30 ثانیه) در حجم نهایی50 میکرولیتر شامل دو میکرولیتر نمونهcDNA، پنج میکرولیتر بافر PCR10X، یک و نیم میکرولیتر $MgCl_2$ 50، یک میکرولیتر 10 mMdNTP، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس 10 میکرومولار، 0/25میکرولیتر از آنزیمDNA پلیمراز Taq (1.25 U)، آب استریل (38/25 میکرولیتر) بر حسب دستورالعمل کیت PCR (vivantis, Malaysia) و با استفاده از دستگاه ترمال‌سایکلر (Bio RAD, U.S.A) ازدیاد ژنی شدند. توالی‌های الیگو نوکلئوتیدی‌ویژه برای‌پرایمرهای‌سنس و آنتی‌سنس β-اکتین‌و آروماتاز در جدول 1 ذکر شده است (Rezaei و همکاران، 2014). محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز 1% آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ آمیزی safe view نمایان شده و توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شدند.

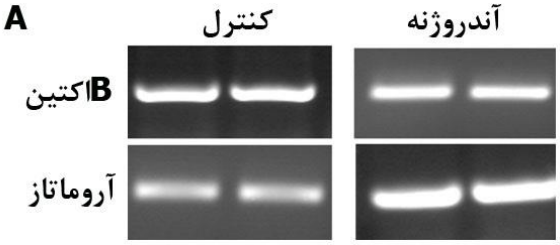
جدول1: ترادف و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت واکنش PCR

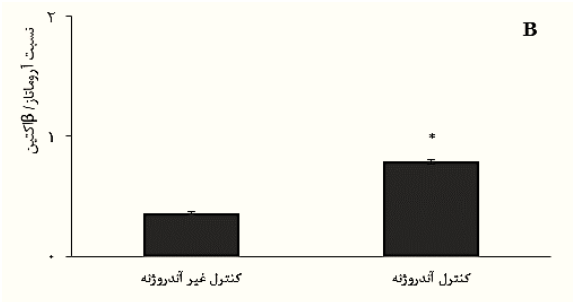
ژن	پرایمر	ترادف	دمای انیلینگ	طول قطعه حاصل(جفت باز)
آروماتاز	سنس آنتی سنس	۵□-GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-۳□ ۵□-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-۳□	۶۱ C°	۲۸۹
β-اکتین	سنس آنتی سنس	۵□-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3′ ۵□- GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA-3′	۵۸ C°	۵۱۱

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل به‌صورت میانگین± SEM ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T- testجفت نشده، آزمون ANOVA یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه 16 آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهاي آماري انجام شده نتایج با P<0/05 معني‌دار 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 (غیرآندروژنه) گردید (شکل1A). سطح mRNA β-اکتین (که به‌عنوان شاهد داخلی استفاده شده است) به‌میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه‌و موش‌های صحرایی‌شاهدمشاهده شد(شکل1A). آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به‌دست 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 غیرآندروژنه به‌میزان 1/19 برابر افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (P<0/05)(شکل 1B). نتایج حاصل نشان داد که فراوانی سطح mRNA آروماتاز، در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر 2، 4 یا 8 میکروگرم گرلین نسبت به گروه شاهد آندروژنه کاهش یافت (شکل2A). سطح mRNA β-اکتین به‌میزان‌نسبتاًبالا و سطح یکسانی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی گروه‌شاهد آندروژنه و موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر مختلف گرلین مشاهده شد (شکل 2A).

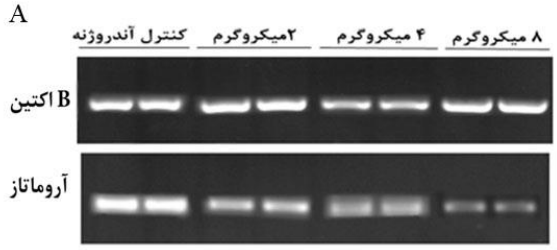


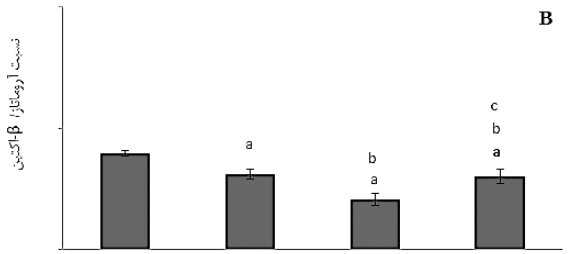


شکل1: میانگین بیان‌نسبی‌ژن آروماتاز در هیپوتالاموس‌موش‌های صحرایی ماده آندروژنه در مقایسه با گروه شاهد غیرآندروژنه (در هر گروه n=5، P<0/05 معنی‌دار گزارش‌شده است). قسمت A؛ الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و آروماتاز ازدیاد شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B؛ میانگین سطح mRNA آروماتاز در هر گروه را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA ازدیاد 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 موش‌های‌صحرایی دریافت کننده مقادیر2، 4 یا 8 میکروگرم گرلین نسبت به گروه شاهد آندروژنه به‌ترتیب به‌میزان 0/22، 0/48 یا 0/24 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 2B).

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های‌صحرایی‌آندروژنه دریافت‌کننده 4 میکروگرم گرلین در مقایسه با 2 میکروگرم گرلین به‌میزان 0/38 برابر کاهش‌یافت‌که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار است (P<0/05) (شکل 2B). میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی آندروژنه تیمار شده با مقدار 8 میکروگرم گرلین در مقایسه با 2 میکروگرم گرلین به‌میزان10 درصد کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست (شکل 2B). میانگین بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی ماده آندروژنه تیمار شده با مقدار 8 میکروگرم گرلین در مقایسه با 4 میکروگرم گرلین به‌میزان 0/32 برابر افزایش‌یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار است (P<0/05) (شکل2B). همان‌طورکه در شکل 2B ملاحظه می‌شود سطح mRNA آروماتاز در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی دریافت‌کننده 4 میکروگرم گرلین نسبت به2یا 8 میکروگرم گرلین از نظر آماری به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است (P<0/05)(شکل 2B).





شکل2: 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 گزارش‌شده است). قسمت A؛ الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و آروماتاز ازدیاد شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B؛ میانگین سطح mRNA آروماتاز در هر گروه را نشان می‌دهد که‌توسط‌نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA ازدیاد شده از mRNA β-اکتین برای نرمال کردن نتایج آروماتاز استفاده شده است. a: نسبت به شاهد آندروژنه، b: نسبت به 2 میکروگرم، c: نسبت به 4 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، 2014؛ Lephart، 1996؛ Maurer، 1974). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند که آندروژن‌ها اثر پیام‌رسانی و سازماندهی بر روی سیستم عصبی دارند و در تمایز جنسی ساختار و عملکرد مغز نقش مهمی ایفا می‌کنند. به‌طوری‌که 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 پری اپتیک و هسته بستر استریا ترمینالیس را در هر دو جنس نر و ماده تنظیم می‌کند. دریافت تستوسترون در روز های یک الی 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، 2008). به‌خوبی ثابت شده است که آروماتاز سیتوکروم P450 یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است. آروماتاز هیپوتالاموسی عملکرد اساسی در ترشح هورمون‌های‌گنادوتروپین‌وتمایز رفتار جنسی موش‌های صحرایی دارد. با توجه به نقش آندروژن ها در شکل‌گیری تمایز جنسی مغز مطالعات زیادی در جهت بررسی عملکرد آندروژن‌ها در هیپوتالاموس صورت گرفت است. Roselli و Resko (1997) 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 تخمک‌گذاری می‌شود (Levallet و Carreau، 2001؛ Roselli و Resko، 1997). هم‌چنین مطالعات گذشته نشان داده است که افزایش در دسترس بودن تستوسترون در سیستم عصبی مرکزی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق افزایش میزان دی هیدرو تستوسترون سبب تنظیم افزایشی گیرنده‌های آندروژنی (گیرنده‌های ویژه تستوسترون) می‌شود. افزایش گیرنده های آندروژنی به نوبه خود محتوی نوروترانسمیتری مغز موش ماده را تغییر داده و تمایز جنسی مغز را به‌سمت نر شدن پیش می‌برد(Roselli و Klosterman، 1998). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند که آندروژن‌ها (تستوسترون) از طریق مکانیسم گیرنده-آندروژن باعث تحریک بیان ژن آروماتاز می‌شوند (Lephart، 1996). تفاوت بیان آروماتاز در جنس نر و ماده به‌دلیل پاسخ‌گویی متفاوت به تستوسترن است. علاوه بر آن مغز جنس نر غلظت بیش‌تری از تستوسترن 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 گیرنده های AR در هیپوتالاموس موش های ماده منجر به افزایش پاسخ دهی هیپوتالاموس به آندروژن‌ها می‌شود. با توجه به این‌که آندروژن ها از طریق مکانیسم گیرنده-آندروژن بیان ژن آروماتاز را تنظیم می‌کنند، احتمالاً تزریق تستوسترون در سومین روز بعد از تولد منجر به افزایش برگشت ناپذیر گیرنده‌های آندروژن در هیپوتالاموس شده و به‌واسطه مکانیسم گیرنده-آندروژن بیان ژن آروماتاز در دوران بلوغ افزایش یافته است (Lephart، 1996).

هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق درون بطنی مغزی هر سه مقادیر2، 4 یا 8 میکروگرم گرلین، بیان ژن آروماتاز هیپوتالاموس را به‌طور معنی‌داری 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، 2014؛ Rezaei و همکاران، 2014). هر چند که در این تحقیق برای اولین‌بار 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 به‌عنوان 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 تنظیم‌و تعدیل اعمال تولیدمثلی ایفا می‌کند(García و همکاران، 2007؛ Fernández-Fernández و همکاران، 2004؛ Sabina و همکاران، 2001). مطالعه در موش‌های صحرایی نر نشان داد که گرلین ترشح آندروژن‌هانظیرتستوسترون‌رابه‌واسطه کاهش‌بیان mRNA فاکتورهای موثر در مسیر استروئیدوژنز (نظیر سیتوکروم P450) کاهش می‌دهد. محققان با مطالعه موش‌های صحرایی نر تحت محدودیت غذایی نشان دادندکه‌در این حیوانات‌علاوه بر افزایش‌میزان‌بیان‌گرلین هیپوتالاموس، میزان بیان ژن LH، بیان ژن آروماتاز (CYP19) و Kiss1 نیز در هیپوتالاموس کاهش می‌یابد (Hanaa و همکاران، 2010).

هرچند 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. کیس پپتین نوروپپتیدی است که در هسته قوسی (ARC) و پری ونتریکولار شکمی قدامی (AVPV) هیپوتالاموس‌سنتز می‌شود و یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های تحریکی محورHPG محسوب‌می‌شود(Thompson و همکاران، 2004). یافته‌های پیشین نشان داده است که گرسنگی که با افزایش ترشح گرلین همراه است یا تزریق گرلین با اثر بر بیان کیس پپتین روی محورHPG اثر می‌گذارد و به‌واسطه تنظیم کاهشی مسیر کیس‌پپتین آزادسازی GnRH/LH را مهار می‌کند (Forbes و همکاران، 2009؛ Wahab و همکاران، 2008). همچنین نشان داده شده است که هیپرگرلینمیا در موش‌های صحرایی نر سبب کاهش بیان ژن‌های *کیس پپتین*، LH- ß و آروماتاز می‌گردد (Hanaa و همکاران، 2010). بنابراین احتمال 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، 1996). علاوه بر آن نشان داده شده است‌که لپتین یکی از هورمون‌های تحریکی بر فعالیت تولیدمثلی بوده و تزریق آن سبب افزایش ترشح هورمون‌های جنسی، GnRH و میزان‌بیان آروماتاز می‌گردد (Watanobe، 2002؛ Magoffin و همکاران، 1999) از آن‌جاکه به‌هنگام افزایش سنتز گرلین میزان سنتز لپتین کاهش می‌یابد (Hanaa و همکاران، 2010؛ Barazzoni و همکاران، 2003). بنابراین کاهش لپتین به‌هنگام تزریق‌گرلین یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات مهاری 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 افزایش‌بیان ژن آروماتاز در هیپوتالاموس نسبت به موش‌های صحرایی ماده غیرآندروژنه 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 دانشگاه‌علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. **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.
2. **Barazzoni, R.; Zanetti, M.; Stebel, M.; Biolo, G.; Cattin, L. and Guarnieri, G., 2003.** Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. astroenterology. Vol. 124, No. 5, pp:1188-1192.
3. **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.
4. **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.
5. **Constantin, S., 2011.** Physiology of the GnRH neuron: Studies from embryonic GnRH neurons. Journal of Neuroendocrinology. Vol. 23, No. 6, pp: 542-553.
6. **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.
7. **Fernández-Fernández, R.; Tena-Sempere, M.; Aguilar, E. and Pinilla, L., 2004.** Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. Neuroscience Letters. Vol. 362, No. 2, pp:103-107.
8. **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.
9. **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. Vol.460, No. 2, pp: 143-147.
10. **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.
11. **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.
12. **Lephart, E.D., 1996.** A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Research Review. Vol. 22, No. 1, pp:1-26.
13. **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.
14. **Maeda, K.; Ohkura, S., 2010.** Neurobiological mechanisms underlying GnRH Pulse generation by the hypothalamus. Brain Research. Vol. 1364, pp: 103-115.
15. **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.
16. **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.
17. **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.
18. **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.
19. **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.
20. **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
21. **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.
22. **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.
23. **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
24. **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.

25. **Thompson, E.L.; Patterson, M.; Murphy, K.G.; Smith, K.L.; Dhillo, 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.

26. **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.

27. **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.