مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ۳۰۸-۳۰۱

اثرات تزریق ارکسینA به درون بطن سوم مغزی بر بیان ژن Translocator protein (TSPO) در تخمدان موش‌های آندروژنه بالغ

رضا فرتوت زاده .M.Sc [۱]، علی خراسانی .M.Sc *[۱]، همایون خزعلی .Ph.D [۲]، فریبا محمودی .Ph.D [۲]

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، ایران، تهران
۲- دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، ایران، تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: alikhorasani1987@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

هدف: اثرات تزریق ارکسینA به درون بطن سوم مغز بر بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های آندروژنه (AND) بالغ و تاثیر آن بر روی سنتز استرویید‌های ضروری در تولید مثل بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بیست و چهار سر موش صحرایی ماده سه روزه در گروه‌های شش‌تایی با تزریق زیر پوستی تستوسترون پروپیونات آندروژنه شدند و شش سر موش ماده دیگر به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. بعد از بلوغ حیوانات در ۵ گروه شش‌تایی به‌ترتیب تزریق مرکزی سالین یا مقادیر مختلف ارکسین A (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را دریافت کردند. تخمدان‌ها به‌صورت دو طرفه خارج و فریز شدند. میزان بیان ژن TSPO با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR تعیین شد.

نتایج: سطح بیان TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی داری افزایش یافت. مقادیر مختلف ارکسین A میزان بیان ژن TSPO را در مقایسه با گروه کنترل آندروژنه به‌طور معنی داری کاهش دادند ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: آندروژن‌ها اثر تحریکی بر میزان بیان TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی ماده اعمال می‌کنند و ارکسین A با کاهش بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز موجب کاهش فعالیت محور تولید مثلی در موش‌های صحرایی آندروژنه می‌شود.

واژگان کلیدی: ارکسینA، TSPO، موش‌های صحرایی آندروژنه

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فعالیت سیستم تولید مثلی تحت کنترل مرکزی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی (HPG) قرار دارد و توسط برهم کنش مجموعه‌ی پیچیده‌ای از پپتیدهای مرکزی و محیطی تنظیم می‌شود. از بین نوروپپتیدهای مرکزی موثر بر فعالیت محور تولید مثلی می‌توان به ارکسین اشاره کرد. ارکسین A پپتید هیپوتالاموسی با ۳۳ اسید آمینه است که به‌طور عمده در هیپوتالاموس جانبی و نواحی مجاور آن سنتز شده و از طریق اتصال به گیرنده شماره ۱ ارکسین (OX1R) در تنظیم دریافت غذا و تعدیل فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی و ترشح گنادوتروپین ها نقش ایفا می‌کند (۴-۱). تحقیقات نشان داده است که ارکسین در سرکوب عمل‌کردهای تولید مثلی نقش دارد و سبب کاهش آزادسازی هورمون‌های جنسی می‌شود (۵ و ۶). 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 (۹-۷). تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که در فولیکول‌های در حال تکوین، TSPO سلول‌های گرانولوزا تحت تحریک FSH بیان می‌شود. 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 می‌یابد (۱۰ و ۱۱). 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 تولید مثلی و رفتار تولیدمثلی جنس ماده را مختل می‌کند و باعث عدم تخمک‌گذاری، عدم رهاسازی سرژ (اوج رهایش هورمون) LH، کاهش پاسخ‌دهی هیپوفیز به GnRH و نازایی می‌شود (۱۲ و ۱۳). یافته‌ها ثابت کرده‌اند که توزیع نورون‌های‌ارکسین با نورون‌های تولید کننده GnRH در ناحیه برجستگی میانی و هسته آرکوئت (ARC) هم‌پوشانی داشته و ارکسین در مهار آزادسازی هورمون‌هایGnRH، LH و FSH دخالت دارد (۱۴). 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 ارکسین در تنظیم فعالیت محور تولیدمثلی نقش داشته و تاکنون گزارشی درباره اثرات ارکسین بر میزان بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز در هیچ یک از گونه‌های جانوری آندروژنه وجود ندارد در این مطالعه، اثرات تزریق مرکزی ارکسین A بر میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های ماده بالغ آندروژنه بررسی می‌شود تا مشخص شود که پپتیدهای مهارکننده آزادسازی GnRH/LH و FSH در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز که در چرخه جنسی موجود ماده و امر تولید مثل موثرند؛ نقش داشته باشند.

مواد و روش‌ها

آزمایش انجام شده یک مطالعه تجربی است و در آن تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب انجمن آمریکایی SPCA (Society for the Prevention of Cruelty to Animals) در سال ۲۰۰۶، رعایت شده است.

واحدهای آزمایشی: موش‌های صحرایی ماده تازه متولد شده (۲۴سر) از نژاد ویستار (Wistar) (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی) ۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپیونات (Sigma, USA) (۱۵) را در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روغن زیتون (۱۶) در روز سوم بعد از تولد از طریق زیر پوستی دریافت کردند. شش سر موش صحرایی نیز با تزریق روغن زیتون به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲±۲۲ 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.

کانول گذاری داخل بطنی و عمل تزریق: حیوانات بعد از بلوغ در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم، با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین و زایلزین (Alfasan Company, Holand) به‌ترتیب به مقدار (۸۰ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و (۱۰میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) (Alfasan-Holland) بی‌هوش شدند. کانول ساخته شده از سرسرنگ تزریقی gauge ۲۲ با استفاده از دستگاه استریوتاکسیک (Stoelting U.S.A.) 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

www.SID.ir
Archive of SID

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 ۲۴ سرموش صحرایی درچهارگروه (در هر گروه n=۶) به‌ترتیب تزریق درون بطن سوم مغزی سالین یا مقادیر مختلف ارکسین (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را در حجم چهار میکرولیتر با استفاده از سرسرنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتر وصل شده بود در ساعت ۱۰تا ۱۲ صبح دریافت کردند. پپتید ارکسین (Anaspec Co, USA) در آب مقطر حل شد. همچنین برای حصول اطمینان از اینکه ارکسین وارد بطن سوم شده است تصاویر بطن سوم مغز بعد از کانول گذاری و برش گیری با مختصات و تصویر بطن سوم مغز از اطلس Paxinos & Watson انطباق داده شد. شش سر موش صحرایی گروه کنترل نیز بعد از بلوغ در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم چهار میکرولیتر سالین را از طریق تزریق درون بطن سوم مغزی دریافت کردند. بعد از دریافت مواد مورد نظر حیوانات بی‌هوش شدند و تخمدان‌ها به‌صورت دو طرفه خارج و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگه‌داری شدند.

مرحله استخراج RNA: نمونه‌های تخمدانی با استفاده از pureZol و دستگاه هموژنایزر هوموژن شدند. RNA کل نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵ درصد 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 زنجیره ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس (RT- PCR): cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ میکروگرم از RNA مطلق، پرایمر پلی‌تیمین، 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 TSPO mRNA 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 cDNA) 50 µl template (2µl), 10× PCR buffer (5µl), 50 mM MgCl2(1.5µl), 10mM dNTP Mix(1µl), 100µM of sense and antisense primers (1µl of each one) and 1.25 U Taq DNA Polymerase (0.25 sterile water(38.25µl) بر حسب 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 آنتی سنس استفاده شده برای ژن β- اکتین به ترتیب برابر با -5′ GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3′ و -5′ GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA -3′ و برای TSPO به‌ترتیب برابر با- 5′- AAGAGCTGGGAGGTTTCACA -3′ و 3′- CCAGGCCAGGTAAGGATACA -5′ است (۱۷ و ۱۸). محصولات β- اکتین و TSPO حاصل از تکثیر ژنی به‌ترتیب ۵۱۱ و ۲۲۳ جفت بازی هستند. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ آمیزی safe view نمایان شده و توسط نرم افزار ImageJکمی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T- testجفت نشده، آزمون ANOVA یک‌طرفه و نرم افزار 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.

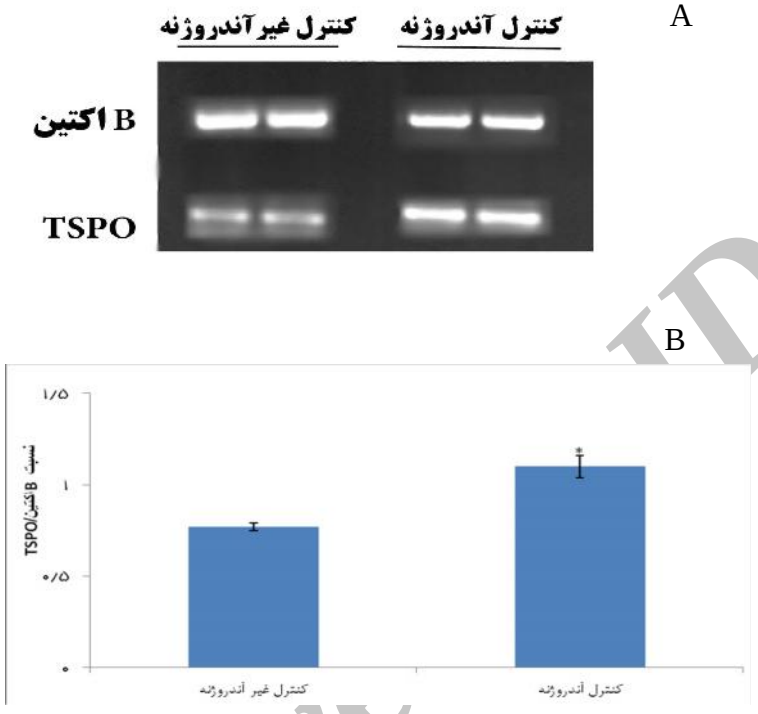
نتایج

فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل۱A). سطح mRNA β-اکتین (که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به‌میزان نسبتا بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده و کنترل مشاهده شد (شکل۱A). شکل ۱، B آنالیز نیمه کمی

Archive of SID
www.SID.ir

تراکم باندهای حاصل از نرم افـزار ImageJ (میـانگین داده‌هـای به‌دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد.

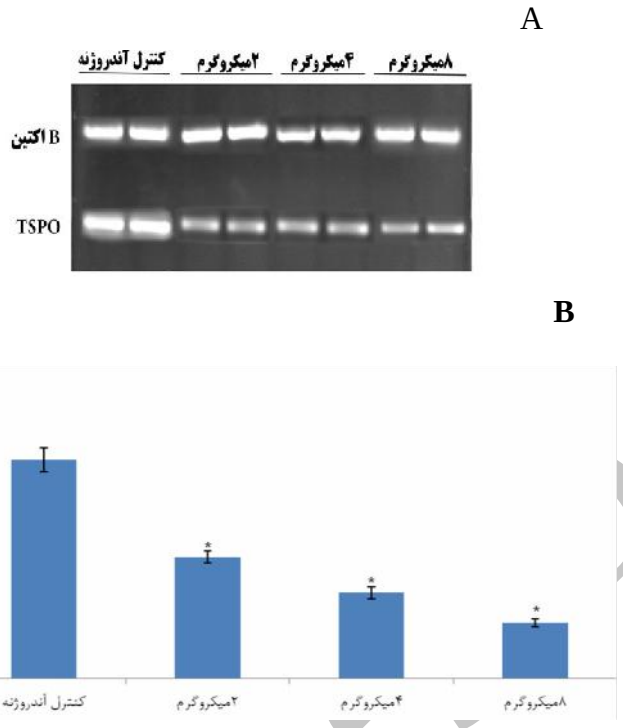
اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل ۱B تخمین‌های نسـبی را نشان می‌دهند ولی همان‌طور که در شکل ۱، B ملاحظه می‌شود سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنـه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل به‌طور معنی‌داری بالاتر است (شکل۱B).



شکل ۱: فراوانی سطح TSPO mRNA *در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل.* A) *الکتروفورز ژل آگـارز بـرای ژن های* β*-اکتین و* TSPO *تشدید شده توسط روش نیمه کمی* RT-PCR *را نشان مـی‌دهـد.* B) *میـانگین سـطح* TSPO *در هـر گـروه (۶=n) را نشـان می دهد که توسط نرم افزار* ImageJ *کمی شده است.* cDNA *تشدید شده از* mRNA β*-اکتین برای نرمـال کـردن نتـایج* TSPO *اسـتفاده شـده اسـت. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (*$p<۰/۰۵$*).* * *نشان دهنده افزایش معنـی‌دار سطح* TSPO mRNA *در تخمـدان مـوش‌هـای صـحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل در سطح احتمال (*$p<۰/۰۵$*).*

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان داد که فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر ۲ و ۴ و ۸ میکروگرم ارکسین A در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل آندروژنه به‌ترتیب به‌میزان ۴۲، ۶۰ و ۷۰ درصد کاهش یافت و این میزان کاهش در هر سه گروه در مقایسه با گروه کنترل آندروژنه از نظر آماری معنی‌دار است (شکل۲A). سطح mRNA β-اکتین (که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به‌میزان نسبتا بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با مقادیر مختلف ارکسین و موش‌های صحرایی گروه کنترل آندروژنه مشاهده شد (شکل۲A). شکل ۲B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای حاصل از نرم افزار ImageJ (میانگین داده‌های به‌دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار مشخص است میانگین بیان ژن TSPO در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر ۲، ۴ یا و ۸ میکروگرم ارکسین A در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل آندروژنه به‌طور معنی-داری پایین‌تر است (شکل ۲B).

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۲ :فراوانی سطح TSPO mRNA *در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر۲، ۴ یا ۸ میکروگرم ارکسین*A. A) *الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های β-اکتین و* TSPO *تکثیر شده توسط روش نیمه کمی* RT-PCR *را نشان می‌دهد.* B) *میانگین سطح* TSPO *در هر گروه (n=۶) را نشان می‌دهد که توسط نرم افزار* ImageJ *کمی شده است.* cDNA *تشدید شده از* mRNA *β-اکتین برای نرمال کردن نتایج* TSPO *استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (p<۰/۰۵).* * *نشان دهنده کاهش معنی‌دار سطح* TSPO mRNA *در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر۲، ۴ یا ۸ میکروگرم ارکسین*A *نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه در سطح احتمال (p<۰/۰۵).*

بحث

در این مطالعه اثرات تزریق زیر پوستی تستوسترون در موش صحرایی ماده در روز سوم بعد از تولد بر روی بیان ژن TSPO در دوران بلوغ بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق زیرپوستی تستوسترون بیان ژن TSPO را نسبت به گروه کنترل در دوران بلوغ افزایش می‌دهد. تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، ثابت کرده است که TSPO یکی از پروتئین‌های کلیدی در مسیر سنتز هورمون‌های استروئیدی است که در روند تولید مثل ضروری هستند. تیمار موش‌های ماده با آندروژن در دوره‌ی بحرانی جنینی و پس از تولد منجر به افزایش سطح بیان ژن و فعالیت TSPO تخمدان می‌شود و در نتیجه سیکل تولید مثلی و رفتار تولید مثلی جنس ماده را مختل می‌کند و باعث عدم تخمک‌گذاری می‌شود به‌عبارت دیگر موجود دیگر نه نر است و نه ماده (۱۹). نشان داده شده است که افزایش در دسترس بودن تستوسترون در سیستم عصبی مرکزی هم به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق افزایش میزان دهیدروتستوسترون سبب تنظیم افزایشی گیرنده‌های آندروژنی (گیرنده‌های ویژه تستوسترون) می‌شود و تعداد نورون‌های حاوی گیرنده آندروژن را افزایش می‌دهد. افزایش گیرنده‌های آندروژنی به نوبه خود محتوای نوروترانسمیتری مغز موش ماده را تغییر داده و تمایز جنسی مغز را به سمت نر شدن می‌برد (۲۰). نتایج حاصل از این تحقیق منطبق بر تحقیقات پیشین است که گزارش کرده‌اند 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 ژن TSPO تخمدان ایفا می‌کنند (۱۱ و ۲۱). تحقیقات پیشین ثابت کرده‌اند تمایز فولیکول‌ها به‌وسیله گنادوتروپین‌ها و استروئیدهای جنسی نظیر پروژسترون، تستسترون و استروژن تنظیم می‌شود (۱۲). 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 (۲۲). تیمار با تستوسترون درجه فعالیت آنزیم آروماتاز

Archive of SID
www.SID.ir

(آنزیمی که آندروژن‌ها نظیر تستوسترون را به استروژن تبدیل می‌کند) (۲۳) و پاسخ‌دهی تخمدان به گنادوتروپین را بالا می‌برد (۱۱). آزمایش‌ها نشان داده‌اند که تیمار با تستوسترون، سطح استروژن سرم را افزایش می‌دهد. بنابراین، اثرات تستوسترون بر روی غلظت TSPO تا حدودی به‌وسیله ساختن

استروژن تخمدانی و به‌واسطه آن میانجی‌گری می‌شود (۲۱).

طبق آنچه در بالا بیان شد. آندروژنه کردن پس از تولد بیان ژن TSPO را به‌طور چشمگیری در دوران بلوغ افزایش می‌دهد که در روند تولید مثل اثر مثبت خواهد داشت.

همچنین در این تحقیق میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی بالغ آندروژنه دریافت‌کننده مقادیر مختلف ارکسین A نسبت به موش های صحرایی بالغ آندروژنه دیگر بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه دریافت کننده مقادیر مختلف ارکسین A به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه آندروژنه کاهش یافت. هر چند که در این تحقیق برای اولین بار اثرات ارکسین بر بیان یکی از ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز بررسی شد و نمی‌توان نتایج حاصل را با تحقیقات پیشین مقایسه کرد ولی می‌توان احتمال دخالت برخی از مکانیسم‌های عصبی مرکزی را در اثرات ارکسین بر بیان ژن TSPO مطرح نمود. تاکنون مشخص شده است که ارکسین بر سیستم تولیدمثلی و آزادسازی هورمون‌های GnRH/LH و FSH در موش‌های بالغ، به‌طور عمده اثرات مهاری اعمال می‌کند (۲۳ و ۲۴). این احتمال وجود دارد که اثرات مهاری ارکسین بر نورون های GnRH به صورت غیر مستقیم و از طریق فعال کردن سایر نورون‌های موجود در ناحیه پره اپتیک اعمال شود که گیرنده نوع یک ارکسین (OXR1) را بیان می کنند و اثرات مهاری بر نورون های GnRH دارند (۷ و ۹). حدود ۸۵ درصد نورون‌های GnRH گیرنده OXR1 را بیان می‌کنند و ۷۵ تا ۸۵ درصد نورون‌های GnRH در ارتباط مستقیم با نورون‌های ارکسین می‌باشند (۶). بنابراین به احتمال زیاد ارکسین از طریق اثر مستقیم بر نورون‌های GnRH سبب مهار گنادوتروپین‌ها می‌شود (۶). در یکسری آزمایشات دیگر، ارکسین A، بعد از تزریق به‌داخل هسته آرکوئت (ARC) و ناحیه برجستگی میانی نیز اثرات مهاری بر آزادسازی پالسی LH نشان داد (۱۴). بر اساس تحقیقات پیشین فرض بر این است که احتمالا ارکسین A به‌طور مستقیم رهاسازی GnRH را از پایانه‌های نورونی ناحیه برجستگی میانی مهار می‌کند و یا شاید به‌صورت غیر مستقیم در ناحیه پره اپتیک میانی، هسته ARC و ناحیه برجستگی میانی و از طریق سیستم‌های مهاری دیگر نظیر β-اندورفین و یا γ- آمینوبوتیریک اسید که سبب مهار GnRH می شود، این عمل را انجام می دهد (۸ و ۲۵). نشان داده شده است که درسلول‌های تکای تخمدان، آندروژن‌ها تحت تحریک LH تولید می شوند و سپس به‌عنوان پیش ساز سنتز استروژن در سلول‌های گرانولوزای تخمدانی تحت تحریک FSH/LH قرار می‌گیرند (۱۲). آندروژن‌ها فعالیت تحریکی FSH در بیان ژن TSPO را در مرحله‌ی اولیه تکوین فولیکولی با افزایش سطح cAMP افزایش می‌دهد (۲۶). بنابراین احتمال دارد که ارکسین از طریق مهار آزادسازی پالسیGnRH و LH موجب کاهش تولید آندروژن‌ها در سلول تکای تخمدان می‌شود و در نتیجه عمل تحریکی آن بر FSH در مسیر بیان ژن TSPO در مراحل اولیه رشد فولیکول کاهش می‌یابد.

بنابراین ارکسین با اعمال مکانیسم‌های ذکر شده بیان ژن TSPO را که در مراحل ابتدایی استرویید‌وژنز و تولید مثل ضروری است را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

نتیجه گیری

در کل همان‌طور که انتظار می‌رفت یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که آندروژنه کردن موش‌هایی که سه روز از تولدشان می‌گذشت بیان ژن TSPO را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد و همچنین تزریق پپتید ارکسین A به‌داخل بطن سوم مغزی موش‌های صحرایی که آندروژنه شده و به سن بلوغ رسیده‌اند بیان ژن TSPO را در تخمدان در مقایسه با موش‌های صحرایی آندروژنه شده‌ی دیگر به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. در نتیجه عمل آندروژنه کردن ژن TSPO را که انتقال دهنده کلسترول در غشای خارجی میتوکندری است و برای ساختن هورمون‌های استرویید‌ی مورد نیاز روند تولید مثل ضروری است را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر ارکسین اثر مهاری بر بیان ژن TSPO دارد و مقدار آن را در تخمدان کاهش می‌دهد، در نتیجه بر عمل تولید مثل اثر مهاری می‌گذارد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله نویسندگان از همکاری سرکار خانم دکتر سمیعی از دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و آقای غفاری از

Archive of SID
www.SID.ir

مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و سرکار خانم ملیحه سلیمی جهت همکاری صمیمانه‌شان کمال تشکر و قدردانی را دارند. ضمنا این آزمایش طرح مصوب نمی‌باشد و صرفا در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد انجام شده است.

منابع

1. Bingham S, Davey PT , Babbs AJ , Irving EA , et al. Orexin-A, An Hypothalamic Peptide With Analgesic Properties. Pain. 2001; 92(1-2): 81-90.

2. Ripley B, Fujiki N, Okura M, Mignot E, et al. Hypocretin Levels In Sporadic And Familial Cases Of Canine Narcolepsy. Neurobiology Of Disease. 2001; 8(3): 525-534.

3. Cai Xue J, Evans Martyn L, Lister Carolyn A, Leslie Ron A, et al. Hypoglycemia Activates Orexin Neurons And Selectively Increases Hypothalamic Orexin-B Levels: Responses Inhibited By Feeding And Possibly Mediated By The Nucleus Of The Solitary Tract. Diabetes. 2001; 1: 105-112.

4. Haynes Andrea C, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, et al. A Selective Orexin-1 Receptor Antagonist Reduces Food Consumption In Male And Female Rats. Regulatory Peptides. 2000; 1-2 (86): 45-51.

5. Hiroto Y, Nobuhiko T, Satoshi T, Miho N, et al. A Selective Orexin-1 Receptor Antagonist, Sb334867, Blocks 2-Dg-Induced Gastric Acid Secretion In Rats. Neuroscience Letters. 2005; 376(2, 11): 137-142.

6. Ning H, GE Y, Su J, Zhang W, et al. Effects of Orexin A on mRNA Expression of Various Neuropeptides in the Hypothalamus and Pituitary, and on Serum LH Levels in Ovariectomized Gilts. Agricultural Sciences in China. 2010; 9(9): 1362–1371.

7. Tatjana Kostic S, Natasa J, Stojilkovic, Stanko S, et al. Pharmacological Doses of Testosterone Upregulated Androgen Receptor and 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta-5-Delta-4 Isomerase and Impaired Leydig Cells Steroidogenesis in Adult Rats. Toxicological Sciences. 2011; 121(2): 397–407.

8. Levin E, Premkumar A, Veenman L, Kugler W, et al. The Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor and Tumorigenicity: Isoquinoline Binding Protein (IBP) Antisense Knockdown in the C6 Glioma Cell Line. Biochemistry. 2005; 44(29): 9924-35.

9. Giatzakis, C. Transcription Regulation of the Mouse Peripheral-type Benzodiazepine Receptor (PBR) Gene in Steroidogenic Cells, Washington D.C: Georgetown University Medical Center; 2005.

10. Joëlle D, Virginie M, Stéphanie C, Christelle R, et al. Ghrelin in Female and Male Reproduction. International Journal of Peptides. 2010; 158102.

11. Irahara M, Tamura T, Matuzaki T, Saito S, et al. Orexin-A Suppresses the Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone via β-Endorphin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006; 281(1): 232-6.

12. Burger L, Haisenleder Dj, Wotton Gm. The regulation of FSH beta transcription by gonadal steroids: testosterone and estradiol modulation of the activin intracellular signaling pathway. Am J PhysiolEndocrinolMetab. 2007; 293(1): 277–85.

13. Ithurralde J, Costas AL, Pessina P, Cueto E, et al. Immunohistochemical determination of estrogen receptor-α in canine vaginal biopsies throughout proestrus, estrus, and early diestrus. Theriogenology. 2013; 80(7): 805–811.

14. Small CJ, Goubillon M-L, Murray JF, Siddiqui A, et al. Central Orexin A Has Site-Specific Effects on Luteinizing Hormone Release in Female Rats. Endocrinology. 2003; 144(7): 3225-36.

15. Robinson J. Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. Reproductio.2006; 132(4): 539–47.

16. Gonzalez DE, Deis RP. Maternal behavior in cyclic and androgenized female rats: Role of ovarian hormones. Physiology & Behavior. 1986; 38(6): 789-93.

17. Akingbemi BT, Braden TD, Kemppainen BW, Hancock KD, et al. Exposure to Phytoestrogens in the Perinatal Period Affects Androgen Secretion by Testicular Leydig Cells in the Adult Rat. Endocrinology. 2007; 148(9): 4475-88.

18. Bar-Ami S, Bendel N, Leschiner S, Levin E. et al. The effects of prostaglandin F2α treatment on peripheral-type benzodiazepine receptors in the ovary and uterus during pseudopregnancy of rats. Biochemical Pharmacology. 2006; 71(4): 472–478.

19. Eacker Sm, Agrawal N, Qian K, Dichek Hl, et al. Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. Mol. Endocrinol. 2008; 22: 623–635.

20. Charles F Roselli. Brain aromatase: Roles in reproduction and neuroprotection. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2007; 106(1–5): 143–150.

21. Campbell RE, Smith MS, Allen SE, Grayson BE, et al. Orexin neurons express a functional

Archive of SID

www.SID.ir

pancreatic polypeptide Y4 receptor. J Neurosci. 2003; 23(4): 1487-97.

22. Genissel C, Carreau S. Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. Molecular and Cellular Endocrinology. 2001; 178(1–2): 141-6.

23. Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep–wake cycle of rats. European Journal of Neuroscience. 2000; 12(2): 726-30.

24. Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, et al. Orexins, Orexigenic Hypothalamic Neuropeptides, Suppress the Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone in Ovariectomized Female Rats. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999; 264(3): 759-62.

25. Couse Jf, Yates M, Deroo Bj, Korach Ks. Estrogen receptor-_ is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. Endocrinology. 2005; 146(8): 3247–62.

26. Stocco C. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. Steroids. 2008; 73(5): 473-87.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2014; 5(3): 301-308

Original Article

Effect of Orexin Infusion into Third Ventricle on the Translocator Protein (TSPO) Gene Experession in the Ovary of Pubertal Androgenized Female Rats

Fartoutzadeh R, M.Sc. [1], Khorasani A, M.Sc. [1]*, Khazali H, Ph.D.[2], Mahmoudi F, Ph.D.[2]

1. M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, ShahidBeheshti University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, ShahidBeheshti University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: fmohsenzade@gmail.com alikhorasani1987@gmail.com

Received: 21 Oct. 2013 Accepted: 10 Mar. 2014

Abstract

Aim: In the present study the effects of central injection of Orexin A on the expression of TSPO gene in the ovaries of pubertal androgenized female rats were investigated.

Material and Methods: 24 neonatal female rats were androgenized on the third day after birth by subcutaneous injection of 50µg TP. Six neonatal female rats in one group were considered as controls. After puberty, the animals in 5 groups (n=6 in each group) received central injections of saline, different doses of Orexin A (2, 4 or 8µg). The ovaries were removed bilaterally and frozen. TSPO gene expression levels was determined by semi quantitative RT-PCR.

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

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

Key word: Orexin A, TSPO, Androgenized rats

Archive of SID

www.SID.ir