

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

رضا فرتوت زاده M.Sc.<sup>۱</sup>، علی خراسانی M.Sc.\*<sup>۱</sup>، همایون خزعلی Ph.D.<sup>۲</sup>، فریبا محمودی Ph.D.<sup>۲</sup>

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 پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹

### چکیده

**هدف:** اثرات تزریق ارسکسین A به درون بطن سوم مغز بر بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های آندروژنه (AND) بالغ و تاثیر آن بر روی سنتز استروئیدهای 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 ارسکسین 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 ارسکسین 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 ارسکسین A با کاهش بیان ژن‌های دخیل در استروئیدوژنز موجب کاهش فعالیت محور تولید مثلی در موش‌های صحرایی آندروژنه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** ارسکسین A، TSPO، موش‌های صحرایی آندروژنه

## مقدمه

هورمون‌های FSH و LH ممکن است در کاهش فعالیت استروئیدوزن 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 استروئیدوزن 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 استروئیدوزن 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 (۲۴س) از نژاد ویستار (Wistar) تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی (۵۰ میکروگرم تستوسترون پروپونات (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  $22 \pm 2$  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 زایلین (Alfasan Company, Holand) به ترتیب به مقدار (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (Alfasan-Holland) بی‌هوش شدند. کانول ساخته شده از سرسرنج 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

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 گنادوتروپین‌ها 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 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 استروئیدوزن 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 نوروهای ارکسین با نوروهای تولیدکننده GnRH در ناحیه برجستگی میانی و هسته آرکوئ (ARC) هم‌پوشانی داشته و ارکسین در مهار آزادسازی هورمون‌های GnRH، LH و FSH دخالت دارد (۱۴). هورمون‌های LH و FSH هر دو در کنترل بیان پروتئین TSPO نقش دارند و هر عامل تغییردهنده ترشح

آنجا که ژن خانه دار - اکتین به طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله تخمدان سنتز می‌شود. تعیین سطح mRNA آن توسط روش RT-PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های cDNA برای ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه) در حجم نهایی (cDNA) 50 µl template (2µl), 10× PCR buffer (5µl), 50 mM MgCl<sub>2</sub>(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) PCR کیت (Bio RAD, Co. U.S.A) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, Co. U.S.A) تشدید ژنی شدند. توالی‌های الیگونوکلوئیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی سنس استفاده شده برای ژن - اکتین به ترتیب برابر با - 5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' و - 5'-GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA-3' برای TSPO به ترتیب برابر با - 5'-AAGAGCTGGGAGGTTTCACA-3' و - 3'-CCAGGCCAGGTAAGGATACA-5' است (۱۷ و ۱۸). محصولات - اکتین و TSPO حاصل از تکثیر ژنی به ترتیب 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 ImageJ کمی شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** نتایج حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون T-test جفت نشده، آزمون ANOVA یک طرفه و نرم افزار SPSS 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

فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرائی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرائی کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱A). سطح mRNA - اکتین (که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرائی آندروژنه شده و کنترل مشاهده شد (شکل ۱A). شکل ۱، B آنالیز نیمه کمی

میلی‌متر پایین تر از خط مربوط به میله‌های گوسی و نوک کانول در مختصات بطن سوم ( $AP=2/3, ML=0/0, DV=6/5$ ) 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 صحرائی در چهار گروه (در هر گروه  $n=6$ ) به ترتیب تزریق درون بطن سوم مغزی سالین یا مقادیر مختلف ارکسین (۲، ۴ یا ۸ میکروگرم) را در حجم چهار 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 تا 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 صحرائی 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 به صورت دو طرفه خارج و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

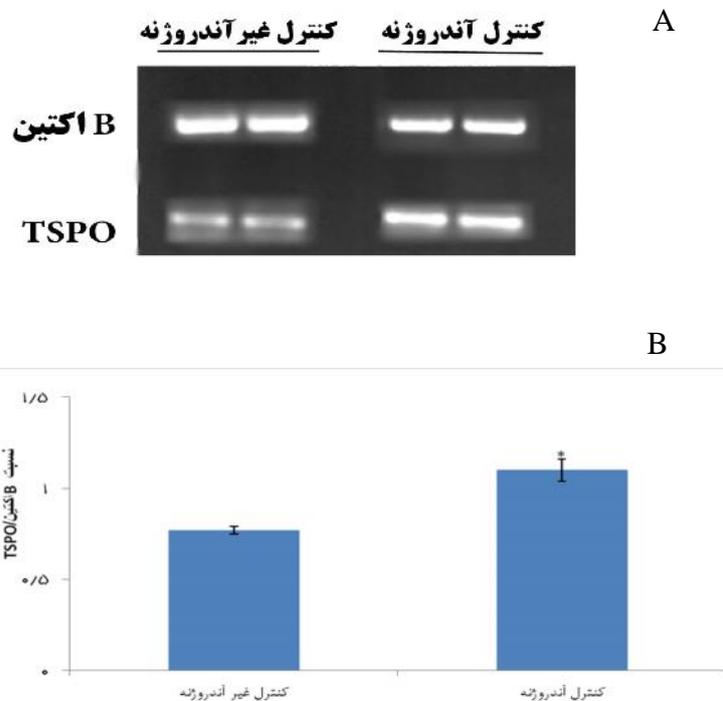
**مرحله استخراج RNA** نمونه‌های تخمدانی با استفاده از pureZol و دستگاه هموژنایزر هوموژن شدند. RNA کل نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵ درصد طبق دستورالعمل کیت PureZol (Bio Rad Co, U.S.A) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (تهیه شده از شرکت سیناژن، ایران) حل شد و تا زمان 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  $A_{260}/A_{280}$  محاسبه گردید.

**مرحله سنتز cDNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR):** cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ میکروگرم از RNA مطلق، پرایمر پلی‌تیمین، آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (vivantis Co, Malaysia) طبق دستورالعمل کیت به وسیله دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD Co, U.S.A) سنتز شد. از

سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل به‌طور معنی‌داری بالاتر است (شکل ۱B).

تراکم باندهای حاصل از نرم افزار ImageJ (میانگین داده‌های به‌دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد.

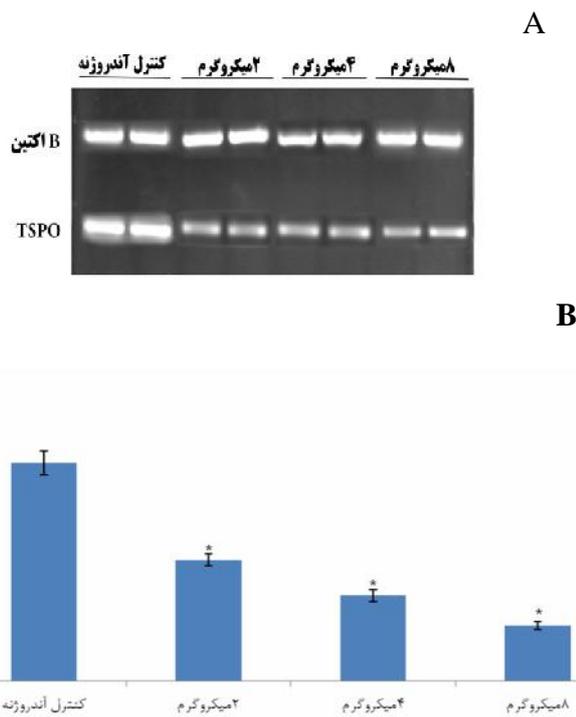
اگر چه نتایج نشان داده شده در شکل ۱B تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند ولی همان‌طور که در شکل ۱A، B ملاحظه می‌شود



شکل ۱: فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل. (A) الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های -اکتین و TSPO تشدید 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 -اکتین برای نرمال کردن نتایج TSPO استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (p < ۰/۰۵). \* نشان دهنده افزایش معنی‌دار سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه شده نسبت به موش‌های صحرایی کنترل در سطح احتمال (p < ۰/۰۵).

(شکل ۲A). 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 ۸ میکروگرم اركسين A در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل آندروژنه به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است (شکل ۲B).

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر ۲ و ۴ و ۸ میکروگرم اركسين 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 (شکل ۲A). سطح mRNA -اکتین (که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به‌میزان نسبتاً بالا و سطح یکسانی در تخمدان موش‌های صحرایی تیمار شده با مقادیر مختلف اركسين و موش‌های صحرایی گروه کنترل آندروژنه مشاهده شد



شکل ۲: فراوانی سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر ۲، ۴، ۸ یا ۱۸ میکروگرم ارکسین A. (A) الکتروفورز ژل آگارز برای ژن های -اکتین و TSPO تکثیر شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. (B) میانگین سطح TSPO در هر گروه (n=6) را نشان می‌دهد که توسط نرم افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از mRNA -اکتین برای نرمال کردن نتایج TSPO استفاده شده است. نتایج به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (p < 0.05). \* نشان دهنده کاهش معنی دار سطح TSPO mRNA در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژنه تحت تیمار با مقادیر ۲، ۴، ۸ یا ۱۸ میکروگرم ارکسین A نسبت به موش‌های صحرایی کنترل آندروژنه در سطح احتمال (p < 0.05).

## بحث

تنظیم افزایشی گیرنده‌های آندروژنی (گیرنده‌های ویژه تستوسترون) می‌شود و تعداد نوروهای 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 به وسیله گنادوتروپین‌ها و استروئیدهای جنسی نظیر پروژسترون، تستوسترون 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 به وسیله FSH را بالا می‌برد (۲۲). تیمار با تستوسترون درجه فعالیت آنزیم آروماتاز

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 زیر پوستی 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 به عبارت 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 به طور مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق افزایش میزان دهیدروتستوسترون سبب

مهار می‌کند و یا شاید به صورت غیر مستقیم در ناحیه پره اپتیک میانی، هسته ARC و ناحیه برجستگی میانی و از طریق سیستم‌های مهاری دیگر نظیر -اندورفین و یا - آمینوبوتیریک اسید که سبب مهار GnRH می‌شود، این عمل را انجام می‌دهد (۸ و ۲۵). نشان داده شده است که در سلول‌های تکای تخمدان، آندروژن‌ها تحت تحریک LH تولید می‌شوند 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 پالسی GnRH 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 استروئیدوژنز و تولید مثل ضروری است را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

### نتیجه گیری

در کل همان‌طور که انتظار می‌رفت یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که آندروژن‌ها در 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 آندروژن‌ها شده و به سن بلوغ رسیده‌اند بیان ژن TSPO را در تخمدان در مقایسه با موش‌های صحرایی آندروژن‌ها شده‌ی دیگر به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. در نتیجه عمل آندروژن‌ها در بیان ژن TSPO را که انتقال دهنده کلسترول در غشای خارجی میتوکندری است و برای ساختن هورمون‌های استروئیدی 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

(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، آندروژن‌ها در 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 آندروژن‌ها دریافت‌کننده مقادیر مختلف ارکسین A نسبت به موش‌های صحرایی بالغ آندروژن‌ها دیگر بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن TSPO در تخمدان موش‌های صحرایی آندروژن‌ها دریافت‌کننده مقادیر مختلف ارکسین A به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه آندروژن‌ها 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 نورون‌های 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 می‌کنند و اثرات مهاری بر نورون‌های 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 احتمالاً ارکسین A به‌طور مستقیم رهاسازی GnRH را از پایانه‌های نورونی ناحیه برجستگی میانی

(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  $\mu$ -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- $\alpha$  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, Kempainen 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 F2 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 HI, 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

مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و سرکار خانم ملیحه سلیمی جهت همکاری صمیمانه‌شان کمال تشکر و قدردانی را دارند. ضمناً این آزمایش طرح مصوب نمی‌باشد و صرفاً 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

- 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- $\alpha$  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.

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

Fartoutzadeh R, M.Sc.<sup>1</sup>, Khorasani A, M.Sc.<sup>1\*</sup>, Khazali H, Ph.D.<sup>2</sup>, Mahmoudi F, Ph.D.<sup>2</sup>

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