

## اثر مقادیر غیر طبیعی تستوسترون بر بیان کیس پپتین در هیپوتالاموس موش صحرایی نر

نویسندگان:

محمدسعید صالحی<sup>۱</sup>، همایون خزعلی<sup>۱\*</sup>، فریا محمودی<sup>۲</sup>، مهیار جان احمدی<sup>۳</sup>

۱- گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.1, Spring 2017

### چکیده:

**مقدمه:** در نرها، تستوسترون با سازوکار بازخوردی منفی تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) و به دنبال آن گونادوتروپین‌ها را تنظیم می‌کند. نورون‌های GnRH گیرنده آندروژن بیان نمی‌کنند، بنابراین اثرات تستوسترون باید از طریق نورون‌های بالادست حساس به استروئید اعمال شود. نورون‌های کیس پپتین به عنوان حلقه گم‌شده در کنترل بازخوردی نورون‌های GnRH در نظر گرفته شده‌اند. با این حال اثرات مرکزی غلظت‌های بالاتر از میزان طبیعی تستوسترون چندان روشن نیست؛ بنابراین هدف از انجام پژوهش کنونی تعیین اثر مقادیر غیرطبیعی تستوسترون بر بیان کیس پپتین در هیپوتالاموس موش صحرایی نر بود.

**روش کار:** سه هفته پس از یک‌بار تزریق دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تستوسترون آندیکانات، غلظت تستوسترون خون اندازه‌گیری شد تا اطمینان حاصل شود تیمارهای آزمایشی در ایجاد غلظت‌های بیش از میزان طبیعی موردنظر مؤثر بوده‌اند. بیان نسبی کیس پپتین در بخش پیشین و پسین هیپوتالاموس با روش qRT-PCR ارزیابی و با بیان کیس پپتین در موش‌های صحرایی کنترل و گونادبرداری شده مقایسه شد (n = ۶ در هر گروه).

**یافته‌ها:** گونادبرداری به شکل چشم‌گیری بیان کیس پپتین را در هیپوتالاموس پسین موش‌های صحرایی افزایش داد. با این حال، در موش‌های صحرایی اخته شده که با غلظت‌های مختلف تستوسترون تیمار شده بودند، بیان کیس پپتین هیپوتالاموس پسین تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت. از سوی دیگر، غلظت‌های بیش از میزان طبیعی تستوسترون بیان کیس پپتین را در هیپوتالاموس پیشین در مقایسه با گروه کنترل را افزایش داد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که مقادیر غیرطبیعی تستوسترون به صورت متفاوت با غلظت‌های فیزیولوژیک آن بر نورون‌های کیس پپتین هیپوتالاموس اثر می‌گذارند.

**واژگان کلیدی:** تستوسترون، کیس پپتین، هیپوتالاموس، موش صحرایی

Pars J Med Sci 2017;15(1):43-49

### مقدمه:

استروئیدهای جنسی گونادی می‌شوند. هورمون‌های جنسی با اثرات بازخوردی مثبت و منفی فعالیت نورون‌های GnRH را کنترل می‌کنند. در نرها، تستوسترون با سازوکار بازخوردی منفی تراوش GnRH و به دنبال آن گونادوتروپین‌ها را تنظیم می‌کند (۱). نورون‌های GnRH گیرنده آندروژن بیان نمی‌کنند (۲)، بنابراین اثرات این استروئید جنسی باید از طریق نورون‌های حساس به استروئید بالادست نورون‌های GnRH اعمال شود.

تولیدمثل فرایند ضروری برای حفظ بقای گونه‌هاست که در کنترل شبکه پیچیده سیگنال‌های تنظیمی قرار دارد. در پستانداران مثلاً و/یا محل اثر اصلی عامل‌های تنظیمی، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گوناد (محور گونادوتروپیک) است. نورون‌های هیپوتالاموسی بیان‌کننده هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) محرک آزادسازی گونادوتروپین‌ها از غده هیپوفیز بوده که این هورمون‌ها نیز به‌نوبه خود موجب سنتز

نویسنده مسئول، نشانی: دکتر همایون خزعلی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. کد پستی: ۱۹۸۳۹۶۹۴۱۱.

پست الکترونیک: h\_khazali@sbu.ac.ir

تلفن تماس: ۰۲۱-۲۹۹۰۳۱۹۲

پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۸

اصلاح: ۱۳۹۶/۵/۲

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۷

متفاوت از غلظت‌های فیزیولوژیک آن عمل کند، در این مطالعه فرض شد که شبکه نورونی کیس‌پپتین نیز به‌عنوان تنظیم‌گر اصلی نورون‌های GnRH ممکن است تحت تأثیر مداخله هورمونی قرار گیرد؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش، تعیین اثرات غلظت‌های غیرطبیعی تستوسترون بر بیان کیس‌پپتین در هیپوتالاموس پسین و پیشین موش صحرایی نر بود.

### روش کار:

این پژوهش بنیادی تجربی روی ۳۰ موش صحرایی نر بزرگ‌سال (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley در دامنه وزنی ۲۲۰ تا ۲۷۰ گرم (۳ تا ۴ ماهه) انجام شد. موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی از مرکز پرورش جانوران آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتخاب و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی - ۱۲ ساعت تاریکی (آغاز روشنایی از ساعت ۷:۳۰ صبح) نگهداری شدند. همه مراحل آزمایش بین ساعت ۱۰ تا ۱۳ و طبق آیین‌نامه اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید بهشتی مورد تأیید کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه شهید بهشتی (کد اخلاق ۹۲۰/۱۰۱۰/د) انجام شد.

برای ایجاد غلظت‌های ثابت تستوسترون در خلال دوره آزمایشی از تستوسترون آندیکانوات (Nebido, Bayer Pharma, Berlin, Germany) استفاده شد که پیش‌تر نشان داده‌شده بود یک‌بار تزریق درون‌ماهیچه‌ای آن به موش صحرایی می‌تواند مقدار تستوسترون خون را دست‌کم به مدت چهار هفته ثابت نگه دارد (۱۵). به‌منظور تعیین تأثیر غلظت‌های بیش از میزان طبیعی تستوسترون، بیان کیس‌پپتین هیپوتالاموسی ۳۰ موش صحرایی که به‌طور تصادفی در پنج گروه آزمایشی تقسیم‌شده بودند، بررسی شد. گروه‌های آزمایشی (n = ۶ در هر گروه) شامل گروه کنترل (CTL)، گروه اخته‌شده (GDX)، گروه اخته‌شده و دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم تستوسترون آندیکانوات به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (GDX+T100)، گروه اخته‌شده و دریافت‌کننده ۲۵۰ میلی‌گرم تستوسترون آندیکانوات به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (GDX+T250) و گروه اخته‌شده و دریافت‌کننده ۵۰۰ میلی‌گرم تستوسترون آندیکانوات به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (GDX+T500) بودند.

موش‌های صحرایی هر پنج گروه با استفاده از ترکیب کتامین (Alfasan، ۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (Alfasan، ۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس شکافی عمودی به طول یک سانتی‌متر در بخش انتهایی شکم ایجاد و بیضه‌ها از اسکروتوم بیرون کشیده شدند. به‌جز در گروه کنترل، در بقیه گروه‌ها، رگ‌های خون‌رسان بیضه با نخ بخیه گره‌زده شد و بیضه‌ها جدا و در نهایت شکاف

در سال ۲۰۰۳ دو پژوهش مستقل نشان دادند بیماری‌رانی که از هیپوگنادوتروپیک هیپوگنادیسم رنج می‌برند دارای جهش‌های حذفی و غیرفعال‌کننده ژن گیرنده کیس‌پپتین (Kiss1r) هستند (۴،۳). این یافته‌ها برای نخستین بار نقش اساسی سیگنالینگ کیس‌پپتین را در کنترل جنبه‌های اساسی عملکرد تولیدمثل برجسته کردند. اکنون بیش از یک دهه است که نقش کلیدی کیس‌پپتین در باروری انسان شناسایی‌شده و پس از آن در طول این مدت پژوهش‌های زیادی نشان دادند کیس‌پپتین با فعال کردن گیرنده Kiss1r در نورون‌های GnRH، آغاز پیوبرتی و به دنبال آن باروری را در تمام پستانداران کنترل می‌کند. با توجه به یافته‌های اولیه که کیس‌پپتین تحریک‌کننده فوق‌العاده نیرومند تراوش LH در شماری از گونه‌ها است (۵)، تعجب‌آور نیست که کیس‌پپتین نیرومندترین تحریک‌کننده نورون‌های GnRH باشد که تاکنون شناخته‌شده است (۷،۶). روش‌های گوناگونی نشان داده‌اند که اکثر (نزدیک به ۸۵ درصد) نورون‌های GnRH در جوندگان بزرگ‌سال گیرنده Kiss1r بیان می‌کنند (۹،۸،۶).

کشف کیس‌پپتین به‌عنوان نیرومندترین محرک شناخته‌شده نورون‌های GnRH، موجب پیشرفت چشمگیر دانش بشر پیرامون تنظیم نوروهورمونی تولیدمثل شده و با توجه به این که بیشتر نورون‌های کیس‌پپتین، گیرنده هورمون‌های استرویدی بیان می‌کنند، به‌عنوان حلقه گم‌شده در کنترل بازخوردی نورون‌های GnRH توسط استرویدهای جنسی در نظر گرفته می‌شوند (۱۰). در هیپوتالاموس جوندگان، نورون‌های بیان‌کننده کیس‌پپتین تنها در هسته‌های آرکوات و آنترو-وتترال پری‌وتربیکولار (Anteroventral periventricular (AVPV)) تمرکز یافته‌اند (۱۱). عقیده بر این است که نورون‌های کیس‌پپتین هسته آرکوات در سازوکارهای بازخوردی منفی استرویدهای جنسی و نورون‌های کیس‌پپتین هسته AVPV در سازوکارهای بازخوردی مثبت استرویدهای جنسی ایفای نقش می‌کنند (۱۰). با این حال اگرچه اطلاعات در مورد سازوکارهای دخیل در اثر بازخوردی مثبت استرادیول به‌سرعت در حال افزایش است، سازوکار اثر بازخوردی منفی هورمون‌های جنسی چندان روشن نیست (۱۲).

شرایط پاتولوژیکی متعددی موجب تولید بیش از میزان طبیعی تستوسترون می‌شوند. همچنین مصرف آندروژن در میان ورزشکاران جز مشکلات اصلی تهدیدکننده سلامت این افراد به شمار می‌آید (۱۳). گزارش شده است که مقادیر بالاتر از میزان طبیعی آندروژن دارای اثرات زیان‌آور بر بسیاری از اندام‌های بدن از جمله سیستم قلبی-رگی و سیستم عصبی مرکزی است (۱۴). در سطح مغز، اثرات هیپوتالاموسی تستوسترون احتمالاً شناخته‌شده‌ترین اثر این استروئید گونادی است. از آن جایی که مقادیر بالاتر از میزان طبیعی تستوسترون ممکن است به‌صورت

Kiss1 (sense) 5'-TGATCTCGCTGGCTTCTTGGC-3'  
 Kiss1 (antisense) 5'-  
 GGGTTCAGGGTTCACCACAGG-3'  
 Beta-actin (sense) 5'-TCTATCCTGGCCTCACTGTC-  
 3'  
 Beta-actin (antisense) 5'-  
 AACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'

با استفاده از رشته اول cDNA به‌عنوان الگو و پرایمرهای اختصاصی، بیان کیس‌پپتین با روش qRT-PCR در گروه‌های آزمایشی بررسی شد. از آنزیم RealQ Plus 2x Master Mix Green (A325402, Ampliqon, Denmark) برای این هدف استفاده شد. هر واکنش در حجم ۲۰ میکرو لیتر بسته و درون دستگاه ABI StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) قرار گرفتند. چرخه دمایی شامل ۱۰ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گرادی برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گرادی برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گرادی برای ۳۰ ثانیه بود.

پس از پایان هر دور کار دستگاه، منحنی‌های ذوب رسم شده برای تمام نمونه‌ها به‌دقت بررسی شد تا اطمینان حاصل شود که برای هر نمونه تنها یک پیک ایجاد شده باشد. علاوه بر این، محصولات qRT-PCR نیز به‌طور تصادفی روی ژل آگاروز یک درصد در دستگاه الکتروفورز افقی اجرا شدند تا اطمینان حاصل شود طول تک باند ایجاد شده در محدوده مورد انتظار است. در نهایت داده‌های qRT-PCR با روش مقایسه‌ای Ct و بیان ژن‌های هدف نسبت به بیان ژن کنترل داخلی بر اساس فرمول  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شدند (۱۷).

از آن جایی‌که در پژوهش کنونی از ۶ موش صحرایی در هر گروه استفاده شده بود، داده‌های بیان نسبی کیس‌پپتین در گروه‌های آزمایشی نسبت به بیان گروه کنترل با آزمون ناپارامتری کروسکال-والیس تحلیل شدند. از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۷/۰۳ برای تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش و  $P < 0/05$  به‌عنوان سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها:

در پژوهش کنونی اثر غلظت‌های بیش از میزان طبیعی تستوسترون بر بیان هیپوتالاموسی کیس‌پپتین بررسی شد. سه هفته پس از تیمار با تستوسترون، غلظت تستوسترون خون اندازه‌گیری شد تا اطمینان حاصل شود تستوسترون آندیکانوات غلظت‌های بیش از میزان طبیعی موردنظر را در گروه‌های آزمایشی ایجاد کرده باشد. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان

شکمی بخیه زده شد. محل بخیه با اکسی‌تتراسایکلین اسپری شد تا از ایجاد عفونت‌های احتمالی جلوگیری شود. سه روز پس از جراحی و اطمینان از سلامت و بهبود نسبی موش‌ها، تستوسترون آندیکانوات در غلظت‌های گفته‌شده در ماهیچه ران آن‌ها تزریق شد. به گروه GDx، روغن کنجد تزریق شد. سه هفته پس از تیمارهای آزمایشی از تمام جانوران خون‌گیری به عمل آمد و سپس موش‌ها کشته شدند.

غلظت تستوسترون سرم خون همه موش‌های صحرایی با استفاده از #RK-61M IZOTOP, ) Testosterone (125I) RIA KIT (Hungary) اندازه‌گیری شد.

پس از پایان دوره آزمایشی، همه موش‌های صحرایی با گاز CO2 بیهوش، سر آن‌ها با گیوتین قطع و مغز بی‌درنگ از جمجمه خارج شد. بافت هیپوتالاموس با کمک چپین نشانه‌هایی جدا شد: برش کرونال اول جلو تقاطع بینایی و برش کرونال دوم پشت اجسام پستانی ایجاد شد. دو برش ساجیتال به فاصله دو میلی‌متر از دو طرف بطن سوم و یک برش افقی زیر مرز تالاموس، هیپوتالاموس را جدا کرد. برای جداسازی هیپوتالاموس پیشین از هیپوتالاموس پسین، برش کرونال سوم در وسط مسیر بینایی ایجاد شد (۱۶). بافت‌های هیپوتالاموس پیشین و پسین پس از جداسازی برای ۲۴ ساعت در نیتروژن مایع قرار داده شد و سپس به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی با استفاده از محلول Ytzol Pure RNA (YT9063؛ یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام گرفت. غلظت همه نمونه‌های RNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ (Thermo, USA) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این به‌طور تصادفی ۱ میکرو لیتر از چند نمونه RNA روی ژل آگاروز یک درصد در دستگاه الکتروفورز افقی انجام شدند تا از کیفیت نمونه‌ها اطمینان حاصل شود. نمونه‌های RNA استخراج‌شده همه گروه‌ها با آنزیم DNase I (#EN051, Thermo, USA) تیمار شدند تا هرگونه آلودگی ژنومی احتمالی از بین رود. بی‌درنگ پس از تیمار نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I، رشته اول cDNA برای هر نمونه سنتز شد. از Easy cDNA Synthesis Kit (#A101162) پارس طوس، ایران) برای سنتز cDNA استفاده شد. در کلیه مراحل از دستورالعمل توصیه‌شده هر کیت استفاده شد.

با توجه به اطلاعات موجود در بانک داده‌ها - NCBI - و با استفاده از توالی ژن کدکننده کیس‌پپتین (Kiss1)، پرایمرهای اختصاصی برای موش صحرایی با نرم‌افزار Allele ID 7 طراحی شدند. از ژن آکتین بتا به‌عنوان کنترل داخلی استفاده و پرایمر اختصاصی آن نیز طراحی شد. توالی پرایمرهای طراحی‌شده چنین بود:

mRNA را در هیپوتالاموس پسین موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد (بیش از ۲۶۰۰ درصد). باین حال، در موش‌های صحرایی اخته شده که با غلظت‌های مختلف تستوسترون تیمار شده بودند، بیان کیس پپتین هیپوتالاموس پسین تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت (جدول ۲).

از سوی دیگر، یافته‌های پژوهش نشان داد غلظت‌های بیش از میزان طبیعی تستوسترون موجب افزایش معنادار بیان Kiss mRNA در هیپوتالاموس پیشین در مقایسه با گروه کنترل می‌شوند (جدول ۳). اگرچه گونادبرداری بیان کیس پپتین را در هیپوتالاموس پیشین حدود ۵۰ درصد کاهش داد، ولی این کاهش از نظر آماری معنادار نبود.

داده شده است، گونادبرداری، غلظت تستوسترون سرم را به شدت کاهش داده و تستوسترون درمانی به صورت وابسته به دوز موجب افزایش غلظت این هورمون استرویدی شده است. (جدول ۱) از آن جایی که نورون‌های کیس پپتین تنها در هسته‌های آرکوات و AVPV هیپوتالاموس جوندگان بیان می‌شود، در پژوهش کنونی بافت هیپوتالاموس به گونه‌ای برش داده شد که هسته آرکوات در هیپوتالاموس پسین و هسته AVPV در هیپوتالاموس پیشین قرار گیرد؛ بنابراین بافت هیپوتالاموس پسین به عنوان نماینده هسته آرکوات و بافت هیپوتالاموس پیشین به عنوان نماینده هسته AVPV در نظر گرفته شد (۱۶). نتایج به دست آمده با روش qRT-PCR نشان داد گونادبرداری به شکل چشم‌گیری بیان Kiss1

جدول ۱: میانگین  $\pm$  خطای استاندارد غلظت خونی تستوسترون در گروه‌های آزمایشی

گروه‌های آزمایشی				
GDX+T500	GDX+T250	GDX+T100	GDX	CTL
۸,۴۹ $\pm$ ۴۵,۶۰	۲,۱۷ $\pm$ ۳۰,۷۳	۲,۹۳ $\pm$ ۱۵,۳۰	۰,۰۳ $\pm$ ۰,۵۹	۰,۷۳ $\pm$ ۵,۲۶
میانگین غلظت تستوسترون خطای استاندارد $\pm$ میانگین (nmol/l)				

جدول ۲: درصد بیان نسبی کیس پپتین در هیپوتالاموس پسین موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل.

گروه‌های آزمایشی				
GDX+T500	GDX+T250	GDX+T100	GDX	CTL
<sup>ns</sup> ۱۴۵ $\pm$ ۲۸	<sup>ns</sup> ۱۸۱ $\pm$ ۶	<sup>ns</sup> ۱۸۵ $\pm$ ۴۹	۲۶۷۱ $\pm$ ۶۲۵*	
درصد بیان نسبی کیس پپتین در هیپوتالاموس پسین نسبت به گروه کنترل (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)				

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است.  $P < 0.05$ ، \*؛ ns: معنادار نیست.

جدول ۳: درصد بیان نسبی کیس پپتین در هیپوتالاموس پیشین موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل.

گروه‌های آزمایشی				
GDX+T500	GDX+T250	GDX+T100	GDX	CTL
۶۴۳ $\pm$ ۳۱*	۸۲۹ $\pm$ ۴۳*	۷۶۴ $\pm$ ۷۹*	<sup>ns</sup> ۵۱ $\pm$ ۱	
درصد بیان نسبی کیس پپتین در هیپوتالاموس پیشین نسبت به گروه کنترل (خطای استاندارد $\pm$ میانگین)				

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است.  $P < 0.05$ ، \*؛ ns: معنادار نیست.

## بحث:

استرویدهای جنسی به صورت متفاوت بیان کیس پپتین را در دو جمعیت نورونی تنظیم می‌کنند. اخته کردن موجب افزایش بیان کیس پپتین در هسته آرکوات می‌شود و تیمار با تستوسترون پس از اخته کردن، از افزایش Kiss1 mRNA در هسته آرکوات موش جلوگیری می‌کند (۱۸). نتایج مشابهی نیز در موش صحرایی نر دیده شده است (۹). به صورت جالب توجه در AVPV نرها، اخته

یافته‌های پژوهش کنونی نشان داد مقادیر بالاتر از میزان طبیعی تستوسترون به صورت چشمگیری (حدود ۷۰۰ درصد) بیان کیس پپتین را در بخش پیشین هیپوتالاموس موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، تیمار موش‌های صحرایی اخته شده با غلظت‌های غیرطبیعی تستوسترون، از افزایش بیان کیس پپتین در هیپوتالاموس پسین جلوگیری می‌کند. شواهد گوناگونی وجود دارد که نشان می‌دهد

به روشنی نشان داد غلظت‌های بالای تستوسترون می‌توانند موجب بروز حالتی شبیه به سرژ بیان کیس‌پتین در هسته AVPV موش‌های صحرایی نر شود، رخدادی که در ماده‌ها به صورت طبیعی در زمان سرژ پیش از تخمک‌ریزی GnRH به وقوع می‌پیوندد.

اکثر نورون‌های کیس‌پتین در هسته‌های آرکوات و AVPV نرها، گیرنده‌های استروژن ( $ER\alpha$  و  $ER\beta$ ) و آندروژن بیان می‌کنند (۲۹،۱۸)، اما به نظر می‌رسد سازوکارهای میانجی‌گر اثرات تستوسترون در دو جمعیت سلول‌های کیس‌پتین متفاوت باشد. در AVPV به نظر می‌رسد اثرات تستوسترون با میانجی‌گری  $ER\alpha$  یا  $ER\beta$  باشد چرا که تیمار استرادیول قادر است به طور کامل اثرات تستوسترون را تقلید کند، اما دای‌هایدرو تستوسترون (استروئید غیرقابل آروماتیزاسیون به استرادیول) بی‌تأثیر بود که نشان می‌دهد گیرنده آندروژن نقشی ندارد. در موش‌های ناک اوت شده برای  $ER\alpha$ ، اثر تستوسترون در تنظیم کیس‌پتین هسته AVPV حفظ شد که نشان می‌دهد  $ER\alpha$  میانجی‌گر این اثر نیست؛ بنابراین ممکن است  $ER\beta$  دخیل باشد. در هسته آرکوات نرها، هم دای‌هایدرو تستوسترون و هم استرادیول قادرند اثرات مهاری تستوسترون را تقلید کنند (۱۸)، از این رو تنظیم کیس‌پتین هسته آرکوات احتمالاً با میانجی‌گری هم گیرنده استروژن و هم گیرنده آندروژن باشد. از این رو تعجب‌آور نیست که در موش‌های نر فاقد  $ER\alpha$  یا فاقد گیرنده آندروژن، به علت این وجود یک گیرنده، نبود گیرنده دیگر را جبران می‌کند، اختلالی در اثر مهاری تستوسترون بر کیس‌پتین هسته آرکوات ایجاد نشود.

### نتیجه‌گیری:

بر اساس یافته‌های پیشین و نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی می‌توان چنین استنباط کرد که مقادیر بالای تستوسترون در مغز پس از آروماتیزاسیون به استرادیول موجب افزایش ناگهانی در بیان کیس‌پتین هسته AVPV می‌شود. از سوی دیگر، غلظت‌های غیرمعمول تستوسترون از طریق گیرنده‌های آندروژنی هسته آرکوات از افزایش بیان کیس‌پتین پس از اخته‌کردن جلوگیری می‌کند.

### تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شهید بهشتی (شماره پژوهانه ۶۰۰۹۲) انجام شده است.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

کردن موجب کاهش Kiss1 mRNA می‌شود و تستوسترون بیان آن را افزایش می‌دهد (۱۸).

عقیده بر این است که نورون‌های کیس‌پتین هسته آرکوات در سازوکار بازخوردی منفی استروئیدها و ایجاد پالس‌های GnRH نقش ایفا می‌کنند. استروئیدهای جنسی به روشنی نورون‌های کیس‌پتین هسته آرکوات را در بسیاری از گونه‌ها مهار می‌کنند. هماهنگ با این اثر، افزایش بیان کیس‌پتین پس از گونادبرداری با افزایش تراوش LH همراه است که می‌تواند تلاشی برای افزایش تولید استروئیدهای جنسی باشد. همچنین، تراوش LH در موش و موش صحرایی گونادبرداری شده و تراوش پالسی LH در میمون ماده و گوسفند تخمدان‌برداری شده در اثر تجویز مرکزی آنتاگونیست کیس‌پتین مهار شده است (۱۹) که این یافته‌ها نیز بار دیگر نشان می‌دهند تحریک تراوش GnRH/LH پس از گونادبرداری به سیگنالینگ کیس‌پتین وابسته است.

بالین‌حال، مسیر یا مسیرهایی که از طریق آن نورون‌های کیس‌پتین هسته آرکوات نورون‌های GnRH را تنظیم می‌کنند روشن نیست. اگرچه پایانه‌های نورون‌های کیس‌پتین هسته آرکوات به سمت POA کشیده شده‌اند (۲۰)، در حال حاضر شواهد اندکی وجود دارد که ارتباط مستقیم آن‌ها را با بدنه نورون‌های GnRH نشان دهد. همچنین به نظر نمی‌رسد تارهای کیس‌پتین به صورت مستقیم با پایانه نورون‌های GnRH در ناحیه بیرونی مدیان ایمنینس در ارتباط باشند چرا که ۱- تارهای کیس‌پتین بسیار اندکی در این ناحیه یافت شده است (۲۱)؛ ۲- شواهد میکروسکوپی مبنی بر ارتباط مستقیم ورودی‌های پیش‌سیناپسی کیس‌پتین با پایانه‌های GnRH وجود نداشته (۲۲) و ۳- نورون‌های کیس‌پتین موش و موش صحرایی، فلوروگولد تزریق شده به صورت محیطی را جذب نکرده‌اند (۲۲،۲۰)؛ بنابراین ارتباط آنا‌تومیکی میان نورون‌های کیس‌پتین هسته آرکوات و نورون‌های GnRH ناشناخته باقی‌مانده است.

از سوی دیگر، به نظر می‌رسد نورون‌های کیس‌پتین هسته AVPV دارای نقش اساسی در فعال‌سازی نورون‌های GnRH به منظور ایجاد سرژ پیش از تخمک‌ریزی GnRH/LH در جوندگان ماده باشند (۲۳) چرا که هسته AVPV ماده‌ها ۱۰ تا ۲۰ برابر نورون‌های کیس‌پتین بیشتری در مقایسه با نرها دارد (۲۴،۲۵)، هم‌زمان با نورون‌های GnRH در زمان سرژ فعال می‌شوند که با روش ایمونوهیستوشیمی و بررسی cFos نشان داده شده (۲۶،۲۷) و به صورت مستقیم نورون‌های GnRH را فعال می‌کنند (۲۸). نقش فیزیولوژیک این دسته از نورون‌ها با توجه به این که نرها به طور طبیعی بازخورد مثبت استرادیول تولید نمی‌کنند و در نتیجه ممکن است در دیگر فرآیندهای وابسته به تستوسترون نقش داشته باشند، روشن نیست. بالین‌حال، نتایج پژوهش حاضر

## References:

- Tilbrook A, Clarke I. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* 2001;64(3):735-42.
- Huang X, Harlan RE. Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res* 1993;624(1):309-11.
- de Roux N, Genin E, Carel J-C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(19):10972-6.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349(17):1614-27.
- Navarro V, Fernández-Fernández R, Castellano J, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004;561(2):379-86.
- Han S-K, Gottsch ML, Lee KJ, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005;25(49):11349-56.
- Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Kisspeptin excitation of GnRH neurons. In: Kauffman AS, Smith JT, editors. *Kisspeptin signaling in reproductive biology*. New York: Springer; 2013:13-31.
- Herbison AE, d'Anglemont de Tassigny X, Doran J, et al. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010;151(1):312-21.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004;80(4):264-72.
- Smith JT. Sex steroid regulation of kisspeptin circuits. In: Kauffman AS, Smith JT, editors. *Kisspeptin signaling in reproductive biology*. New York: Springer; 2013:275-95.
- Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* 2009;30(1):26-33.
- Herbison AE. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015: 399-467.
- Harmer PA. Anabolic-androgenic steroid use among young male and female athletes: is the game to blame? *Br J Sports Med* 2010;44(1):26-31.
- Basaria S. Androgen abuse in athletes: detection and consequences. *J Clin Endocrinol& Metab* 2010;95(4):1533-43.
- Callies F, Kollenkirchen U, Von Zur Mühlen C, et al. Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;111(04):203-8.
- Salehi MS, Namavar MR, Jafarzadeh Shirazi M, et al. A simple method for isolation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei of the rat hypothalamus. *Int J Exp Clin Anat* 2012;6-7:48-51.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005;146(7):2976-84.
- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 2009;29(12):3920-9.
- Yeo S-H, Herbison AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* 2011;152(6):2387-99.
- Clarkson J, D'Anglemont de Tassigny X, Colledge W, et al. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009;21(8):673-82.
- Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, et al. Ultrastructural Evidence of Kisspeptin-Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Interaction in the Median Eminence of Female Rats: Implication of Axo-Axonal Regulation of GnRH Release. *J Neuroendocrinol* 2011;23(10):863-70.
- Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev* 2008;57(2):277-87.
- Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006;147(12):5817-25.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007;148(4):1774-83.
- Clarkson J, de Tassigny XdA, Moreno AS, et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008;28(35):8691-7.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006;26(25):6687-94.
- Liu X, Porteous R, de Tassigny XdA, et al. Frequency-dependent recruitment of fast amino acid and slow neuropeptide neurotransmitter release controls gonadotropin-releasing hormone neuron excitability. *J Neurosci* 2011;31(7):2421-30.
- Clarkson J, Shamas S, Mallinson S, et al. Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse. *J Neuroendocrinol* 2012;24(6):907-15.

## Effects of abnormal levels of testosterone on the expression of hypothalamic kisspeptin in male rats

Mohammad Saied Salehi<sup>1</sup>, Homayoun Khazali<sup>1\*</sup>, Fariba Mahmoudi<sup>2</sup>  
Mahyar Janahmadi<sup>3</sup>

Received: 2017/7/05

Revised: 2017/24/07

Accepted: 2017/30/07

1. Dept of Animal Physiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.1, Spring 2017

Pars J Med Sci 2017;15(1):43-49

### *Abstract:*

#### **Introduction:**

In males, testosterone via negative feedback mechanism regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin secretion. GnRH neurons do not express androgen receptor, therefore effects of testosterone must be mediated via upstream steroid sensitive neurons. Kisspeptin neurons considered as a missing link in the feedback regulation of GnRH neurons, however central effects of supraphysiological levels of testosterone are not well understood. Therefore the aims of the present study were to evaluate impact of abnormal levels of testosterone on kisspeptin expression in the male rat hypothalamus.

#### **Material and Methods:**

Three weeks following single injection of 100, 250 and 500 mg/kg testosterone undecanoate, serum testosterone concentration was measured to ensure that experimental treatments were effective to produce desired supraphysiological levels of testosterone. Relative expression of kisspeptin in the anterior and posterior hypothalamus were evaluated using qRT-PCR and compared with control and gonadectomized (GDX) rats (n=6 in each group).

#### **Results:**

Gonadectomy remarkably increased kisspeptin expression in the posterior hypothalamus. However, in GDX rats treated with different levels of testosterone, kisspeptin expression in the posterior hypothalamus did not have significant difference with control. On the other hand, supraphysiological levels of testosterone increased kisspeptin expression in the anterior hypothalamus compared to control.

#### **Conclusion:**

It seems that abnormal levels of testosterone affect hypothalamic kisspeptin expression differently with its physiological levels.

**Keywords:** Testosterone, Kisspeptin, Hypothalamus, rat

\* Corresponding author Email: h\_khazali@sbu.ac.ir