

نقش سیستم نورآدرنرژیک مرکزی در اثر اسیدهای آمینه تحریکی بر ترشح هورمون FSH در رت

سیما شهابی^{۱*}، دکتر علی اکبر مقدم نیا^۲

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: اسیدهای آمینه تحریکی از واسطه‌های عصبی مرکزی هستند که دارای اثرات تحریکی بر ترشح گونادوتروپین‌ها در حیوانات ماده و نر می‌باشند. در این مطالعه نقش اسیدهای آمینه تحریکی بر فعالیت نرونهاي نورآدرنرژیک مرکزی (NA) مستقر در هسته لوکوس سرلوتوس در ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH)، بررسی گردید.

مواد و روشها: جهت انجام آزمایشها، از موشهای صحرانی بالغ نر استفاده گردید. ابتدا به روش استریوتاکسی، در هسته لوکوس سرلوتوس یک کانول راهنما نصب شد. پس از گذشت مدت زمان لازم بعد از عمل جراحی به حیوانات کانول‌گذاری شده، گلوتامات به میزان ۲۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر در درون هسته لوکوس سرلوتوس تزریق شد. ده دقیقه بعد از تزریق، نمونه خونی از حیوانات تهیه شد. برای بررسی نقش اصلی هسته لوکوس سرلوتوس، تخریب دو طرفه هسته توسط DSP-4 صورت گرفت و بعد از گذشت یک هفته جهت تخریب کامل نرونهاي نورآدرنرژیک، گلوتامات را درون هسته، تزریق کرده و بعد از ده دقیقه نمونه خونی تهیه شد. میزان FSH در نمونه سرمی به روش IRMA اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: غلظت FSH بعد از تزریق گلوتامات در مقایسه با میزان آن بعد از تزریق سالین افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0/02$). تخریب دو طرفه هسته لوکوس سرلوتوس توسط DSP-4 و سپس تزریق گلوتامات در هسته مذکور نیز، کاهش معنی‌داری در میزان این هورمون نسبت به میزان آن در گروهی که فقط گلوتامات دریافت کرده بودند، داشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده حاکی از نقش مؤثر سیستم نورآدرنرژیک مرکزی و به ویژه نرونهاي خروجی از هسته لوکوس سرلوتوس در وساطت اسیدهای آمینه تحریکی بر ترشح FSH می‌باشد. **واژه‌های کلیدی:** سیستم نورآدرنرژیک مرکزی، هسته لوکوس سرلوتوس، اسیدهای آمینه تحریکی، هورمون محرکه فولیکولی، رت.

مقدمه

گزارشات متعدد حاکی از نقش اسیدهای آمینه تحریکی، (Excitatory Amino Acid, EAA) در تنظیم اعمال نورآندوکراین می‌باشد. بطوریکه نقش اساسی را در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، از جمله هورمون محرکه فولیکولی (FSH) دارند (۱ و ۲). براساس مطالعات انجام شده، محل اثر اسیدهای آمینه تحریکی در تنظیم ترشح

گونادوتروپین‌ها در هیپوتالاموس می‌باشد، نه در هیپوفیز. زیرا اولاً "تزریق اسیدهای آمینه تحریکی مانند گلوتامات در داخل هیپوفیز اثری بر ترشح هورمون‌ها ندارد (۳)، ثانیاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی مانند گلوتامات در داخل

□ - هزینه این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۷۸۶ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

بطن مغز موجب تحریک ترشح گونادوتروپین ها می شود (۴) و ثالثاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی از قبیل آسپاراتات و گلوتامات با غلظتهای بالا در هسته های مختلف هیپوتالامیک موجب ترشح گونادوتروپین ها شده است (۵). بنابراین اسیدهای آمینه تحریکی، نقش خود را در تنظیم ترشح گونادوتروپین ها، از طریق تحریک ترشح GnRH ایفا می کنند (۶). این اثر خود را بر روی ترشح GnRH در هسته قوسی که محل پایانه های اعصاب حاوی GnRH می باشد (۷) و منطقه پراپتیک که محل اجسام سلولی اعصاب حاوی GnRH می باشد، اعمال می نماید (۸). وجود گیرنده های اسیدهای آمینه تحریکی بر روی اعصاب حاوی GnRH ممکن است دال بر اثر مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی در تحریک این اعصاب و ترشح محتویات آن یعنی GnRH باشد (۵ و ۹).

لذا در این مطالعه، تلاش بر آن است تا با تزریق مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی به هسته لوکوس سرلوئوس و اندازه گیری میزان هورمون محرکه فولیکولی (FSH) سرم خون، جزئیات ارتباط دو سیستم نورآدرنژیک مرکزی و اسیدهای آمینه تحریکی در ترشح گونادوتروپین ها، هرچه بیشتر روشن شود. همچنین اثر تجویز اسیدهای آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH) از طریق سیستم نورآدرنژیک مرکزی (هسته لوکوس سرلوئوس) بررسی شده که می تواند شاخصی بر نقش تنظیم کننده اسیدهای آمینه درونزا (endogenous) در ترشح هورمون محرکه فولیکولی باشد.

مواد و روشها

■ حیوانات: برای انجام تحقیق از موشهای صحرایی (Rat) نر بالغ از گونه Wistar، در محدوده وزنی ۱۵۰-۲۵۰ گرم استفاده شد.

■ مواد: در این آزمایش از پنتوباریتال سدیم (نمبوتال)، گلوتامات دی سدیم، DSP-4، سیمان مورد استفاده در دندانپزشکی و حلال آن و فرمالدئید استفاده شد.

■ روش کار: قبل از انجام آزمون مورد نظر، ابتدا به روش استریوتاکسی، یک کانول راهنما جهت تزریق داروها در هسته لوکوس سرلوئوس بر روی جمجمه حیوان نصب شد. برای این کار، ابتدا حیوانات را با تزریق داخل صفاقی (I.P) پنتوباریتال سدیم به میزان ۴۵mg/kg، بیهوش کرده و سپس با استفاده از اطللس پاکسینوز کانول راهنما را با مشخصات $L=1/58ml$ AP = -۱۰/۰۴ml و $DV=6ml$ (۱۰) ابتدای هسته قرار داده و بر سطح جمجمه توسط سیمان دندانپزشکی ثابت کردیم (۱۰). تزریق محلولهای دارویی با سرعت ۲ میکرولیتر در ثانیه و توسط یک کانول تزریق که به لوله رابط پلی اتیلنی و سرنگ هامیلتون متصل بوده و در درون کانول راهنما قرار می گرفت، صورت گرفت. ۱۰ الی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق دارو به هسته، خونگیری از گوشه چشم حیوان صورت می گرفت (۱۱) و سپس سرم از طریق ساتریفوژ نمونه های بدست آمده با ۳۰۰۰ دور در دقیقه تهیه نموده و تا زمان استفاده برای تعیین مقدار هورمون محرکه فولیکولی در سرمای ۲۰- درجه سانتیگراد، نگهداری می کردیم.

به منظور تخریب شیمیایی هسته لوکوس سرلوئوس از نوروتوکسین انتخابی اعصاب نورآدرنژیک که DSP-4 می باشد، استفاده شد. این توکسین در حین عمل جراحی استریوتاکسی توسط سرنگ هامیلتون به درون هر دو هسته لوکوس سرلوئوس تزریق می شد و بعد از گذشت یک هفته به منظور تخریب کامل سیستم نورآدرنژیک، گلوتامات به درون کانول راهنما تزریق شده و خونگیری صورت می گرفت.

به منظور تعیین صحت کانول گذاری بعد از اتمام هر آزمون ماده قرمز خنثی (Neutral red) به میزان ۲ میکرولیتر توسط سرنگ هامیلتون در هسته لوکوس سرلوئوس تزریق و پس از کشتن حیوان توسط اتر و جدا کردن سر، بافت مغز از درون جمجمه بیرون آورده و به مدت یک هفته در فرمالدئید ۱۰٪ قرار داده شد. برشهای بافتی از بافت ثابت شده مغز، تهیه و محل تزریق رنگ در

ANOVA یکطرفه و سپس تست Newman-Keuls استفاده شد. اختلاف در داده‌ها با $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

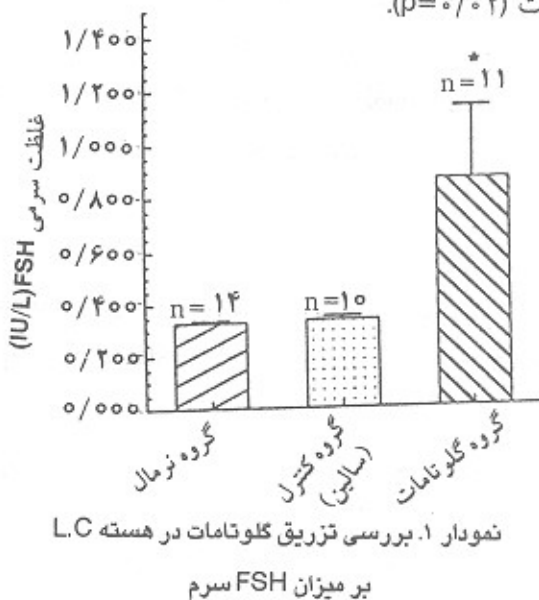
یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل غلظت سرمی هورمون محرکه فولیکولی در موش بالغ نر، در محدوده $0.4 \text{ IU/L} - 0.26$ بود (جدول ۱).

جدول ۱. تغییرات غلظت سرمی FSH در گروه‌های مختلف مورد بررسی موش‌های صحرانی

غلظت سرمی FSH (IU/L)	گروه‌های مورد آزمایش
0.3279 ± 0.011	نرمال (n=14)
0.3380 ± 0.016	سالمین (کنترل) (n=10)
0.8627 ± 0.27	گروه Glu (n=11)
0.3211 ± 0.008	گروه Glu & DSP-4 (n=9)

تزریق گلوتامات در داخل هسته لوکوس سرلوتوس موجب افزایش ترشح هورمون FSH گردید (نمودار ۱) به گونه‌ای که غلظت سرمی هورمون در این حالت در مقایسه با گروه نرمال و گروه کنترل اختلاف معنی دار داشت ($p = 0.02$).



زیر میکروسکوپ ردیابی می‌شد. نتایج بدست آمده از آزمایشاتی که در آنها کانول راهنما به طرز صحیح در هسته لوکوس سرلوتوس قرار نگرفته بود، حذف می‌شد. غلظت هورمون محرکه فولیکولی در سرم‌های فریز شده با استفاده از کیت آزمایشگاهی FSH-IRMA 1125 و با حساسیت 1 IU/L به روش IRMA اندازه‌گیری شد. در این مطالعه گروه‌های آزمایشی از حیوانات در نظر گرفته شده به ترتیب ذیل می‌باشند:

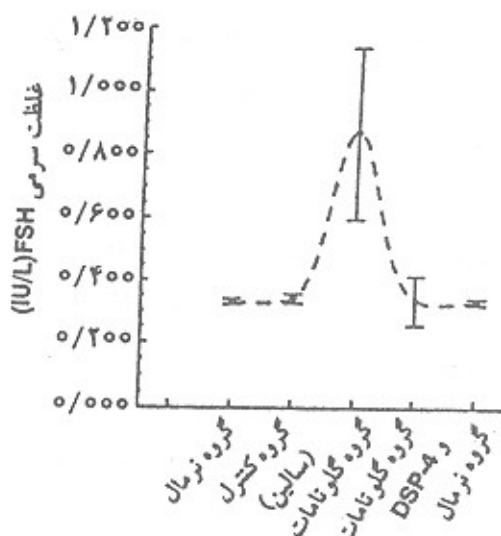
■ گروه نرمال: گروهی که هیچ عمل جراحی بر روی آنها صورت نگرفته‌است، از این گروه خونگیری انجام و میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم آنها اندازه‌گیری شد.

■ گروه کنترل: در این گروه موش‌های کانول‌گذاری شده بعد از بهبودی از جراحی انتخاب می‌شدند. سپس سالمین به میزان ده میکرولیتر به درون کانول آنها تزریق شده و بعد از ده دقیقه خونگیری انجام می‌گرفت. میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم خون آنها اندازه‌گیری می‌شد.

■ گروه گلوتامات: در این گروه موش‌های کانول‌گذاری شده بعد از بهبودی از جراحی انتخاب می‌شدند و سپس گلوتامات به میزان 20 میکروگرم در 10 میکرولیتر توسط سرنگ هاملتون و رابط پلی اتیلنی مرتبط با کانول تزریقی به درون هسته لوکوس سرلوتوس از طریق کانول هدایتی تزریق می‌شد و بعد از ده دقیقه خونگیری انجام می‌گرفت و میزان هورمون محرکه فولیکولی سرم اندازه‌گیری می‌شد.

■ گروه گلوتامات DSP-4: در این گروه ابتدا به روش استریوتاکسی، DSP-4 که یک نوروتوکسین انتخابی نرونها نورآدرنژیک می‌باشد را به میزان 50 میکروگرم در 1 میکرولیتر ، بوسیله سرنگ هاملتون ۵ تا ۷ روز به منظور تخریب کامل نرونها نورآدرنژیک، گلوتامات به میزان 20 میکروگرم در 10 میکرولیتر به هسته لوکوس سرلوتوس از طریق کانول راهنما تزریق کردیم و بعد از 10 دقیقه خونگیری صورت گرفت و میزان FSH سرم اندازه‌گیری شد.

■ آنالیز آماری: برای مقایسه گروه‌های آزمایش از تست



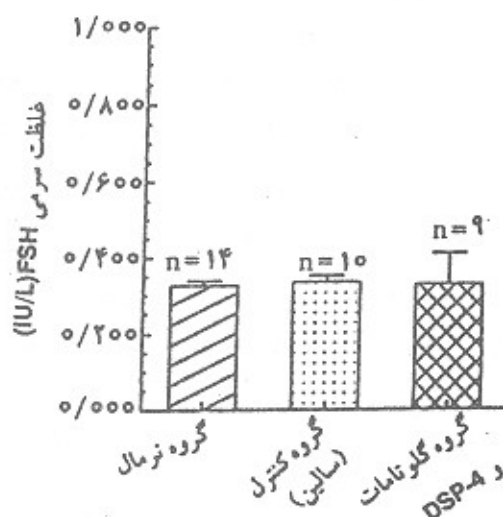
نمودار ۴. نقش سیستم نورآدرنژیک (هسته LC) بر اثرات تحریکی گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته

بحث

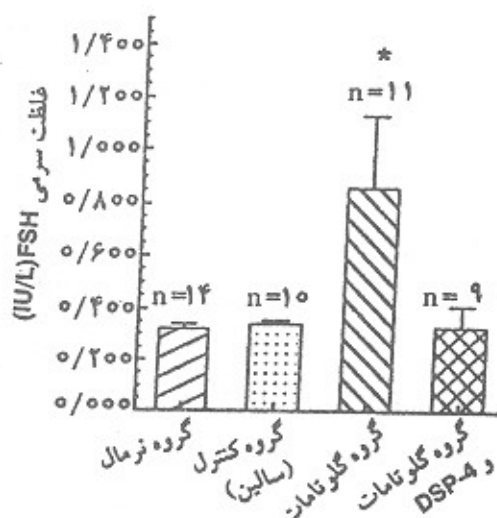
گزارشاتی مبنی بر نقش اسیدهای آمینه تحریکی در تحریک ترشح گونادوتروپین‌ها (۱۲) از طریق تحریک ترشح GnRH (۱۳ و ۱۴) در مناطق میانی هیپوتالاموس و منطقه پراپتیک و هسته قوسی از هیپوتالاموس ارائه شده است (۱۲).

وجود گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی در روی اعصاب حاوی GnRH نیز حاکی از دخالت اسیدهای آمینه تحریکی GnRH و همچنین ترشح گونادوتروپین‌ها می‌باشد (۱۴). بطوریکه حساسیت منطقه پراپتیک (محل جسم سلولی نرونهاي حاوی GnRH) به NMDA^۱ که نوعی اسید آمینه تحریکی می‌باشد و حساسیت منطقه برجستگی میانی و هسته قوسی (محل پایانه‌های نرونهاي حاوی GnRH) به آگونیستهای غیر NMDA که نوعی دیگر از اسیدهای آمینه تحریکی هستند، مشاهده شده است (۱۵). علی‌رغم وجود ارتباط مستقیم بین اثر اسیدهای آمینه تحریکی و سلولهای GnRH، مطالعات دیگری نیز دال بر وجود ارتباط غیرمستقیم بین اثر اسیدهای آمینه تحریکی

نمودار ۲ عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان هورمون FSH خون در گروهی که هسته، تخریب شیمیایی شده با گروه کنترل و گروه نرمال را نشان می‌دهد. پس از ۷ روز قرار گرفتن اعصاب نورآدرنژیک هسته لوکوس سرلوتوس در معرض نوروتوکسین DSP-4، این هسته تخریب شد که موجب حذف کامل اثر تحریکی دی‌سیدیم گلوتامات بر ترشح FSH گردید (نمودار ۳ و نمودار ۴).



نمودار ۲. تاثیر تخریب شیمیایی سیستم نورآدرنژیک هسته LC با DSP-4 در جلوگیری از اثرات تحریکی گلوتامات در این ناحیه بر غلظت سرمی FSH



نمودار ۳. نقش سیستم نورآدرنژیک هسته لوکوس سرلوتوس بر اثرات گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته

اسید آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم عصبی هسته لوکوس سرلوتوس که جایگاه اصلی سیستم نورآدرنژیک مرکزی است، می باشد.

این مطلب همچنین بیانگر آن است که تنظیم ترشح هورمون محرکه فولیکولی، نه فقط از طریق مناطق هیپوتالاموسی بلکه از طریق مناطق خارج هیپوتالاموسی نیز می باشد.

بنابراین این امکان وجود دارد که با تحریک هسته لوکوس سرلوتوس از طریق گلوتامات، اعصاب خروجی از هسته لوکوس سرلوتوس که به طرف هیپوتالاموس می روند و ترشح توأم (colocalization) نوراپی نفرین گلوتامات را بر روی هیپوتالاموس به همراه دارند (۱) موجب تحریک نرونهای حاوی GnRH در هیپوتالاموس شده و در نتیجه موجب افزایش ترشح هورمون محرکه فولیکولی شده است. همچنین تأثیر DSP-4 که یک نوروتوکسین اختصاصی برای سیستم نورآدرنژیک می باشد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است، در کاهش معنی دار ($p=0/02$) میزان هورمون FSH سرم حیوانات مورد آزمایش، نیز نقش بارز این هسته را در تنظیم سیستم نوروآندوکراین مشخص کرده بطوریکه اثر تحریکی گلوتامات بر ترشح هورمون محرکه فولیکولی بعد از تخریب این هسته، حذف شد. در مجموع می توان نتیجه گرفت که:

- ۱- هسته لوکوس سرلوتوس یکی از مناطق مهم در تنظیم ترشح GnRH و FSH می باشد و می توان بعنوان یک هسته مرکزی در کنترل ترشح گونادوتروپین ها از آن نام برد.
- ۲- اسیدهای آمینه تحریکی بخشی از اثرات خود را برای تحریک ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم نورآدرنژیک مرکزی موجود، در هسته لوکوس سرلوتوس، اعمال می نماید.

و تحریک سلولهای GnRH در هیپوتالاموس وجود دارد. بطوریکه مطالعات انجام شده بر روی موشهای بالغ نر و ماده علاوه بر اینکه اثر فعالیت C-Fos (C-Fos) ژن تولید کننده پروتئین FOS می باشد که به عنوان ردیابهای سلولی برای فعالیت عصبی مورد استفاده قرار می گیرد)، متأثر از NMDA را در مناطق هسته قوسی، برجستگی میانی، OVLT، که محل جسم سلولی نرونهای حاوی GnRH می باشند را نشان داده اند، این اثر در مناطق دیگری مانند کورتکس مغز و همچنین در هسته لوکوس سرلوتوس که به عنوان جایگاه اصلی سیستم نورآدرنژیک مرکزی می باشد، نیز مشاهده شده است (۱۵). این مطالعات روشنگر اثرات اسیدهای آمینه تحریکی در نقاط مختلف CNS، در داخل هیپوتالاموس بر روی ترشح گونادوتروپین ها، بالاخص هورمون محرکه فولیکولی می باشند.

بررسی این مطالعات و همچنین وجود ارتباط آناتومیک بین هسته لوکوس سرلوتوس و برجستگی میانی و مناطق دیگر هیپوتالاموس (۱۵)، این تصور را پیش می آورد که اسیدهای آمینه تحریکی ممکن است از طریق سیستم نورآدرنژیک هسته لوکوس سرلوتوس بر ترشح هورمون محرکه فولیکولی تأثیر بگذارند. بررسی صحت این موضوع در موش صحرایی از اهداف اصلی این تحقیق بوده است. بر اساس نتایج بدست آمده در گروه نرمال غلظت سرمی هورمون محرکه فولیکولی در محدوده ۰/۴-۰/۲۶ IU/L بوده است.

گلوتامات به عنوان یکی از واسطه های عصبی شناخته شده که بیشتر از بقیه اسیدهای آمینه تحریکی در بافت مغز یافت شده (۱۶) به عنوان یک مداخله گر تنظیمی در سیستم نوروآندوکراین مشخص شده است (۵).

نتایج حاصله در این تحقیق بعد از تزریق گلوتامات به هسته لوکوس سرلوتوس در موش صحرایی نر افزایش معنی دار در میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم خون را نشان می دهد ($p=0/02$) که بیانگر اثر تحریکی این

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر شهریانو عریان استاد دانشگاه تربیت معلم بخاطر همکاری صمیمانه و زحمات آقای قلی اسداله زاده متصدی آزمایشگاه و آقای فرامرز کردنائیچ و خانم فاطمه پاکزاد و همچنین معاونت امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل تأمین اعتبار این طرح تحقیقاتی تقدیر و تشکر می شود.

References

1. Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ. Norepinephrine neuronse in mouse locus coeruleus express c-fos protein after N- Methyl D,L - Aspartic Acid (NMDA) treatment. Brain Res 1991; 561: 11-19.
2. Honaramooz A, Cook SJ, Beard AP, Bartiewsk PM, Rawllings NC. Nitric oxide regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifersl. J Neuroendocrinol 1999; 11(9): 667-76.
3. Blandina P, Johnson D, Walcott J, Goldfrab J. Release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamus by stimulation of N-Methyl D,L Aspartic Acid receptors. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263(1): 61-68.
4. Lopez FJ, Donso AO, Negero - Villar A. Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol - induced LH surge in ovariectomized rats. Endocrinol 1990; 126(3): 1771-1773.
5. Lopez FJ, Donso AO, Negero - Villar A. Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone secretion. Endocrinol 1992; 130 (4): 1986-1992.
6. Bettendorf M, De-Zegher F, Albers N, Hart CS, Kaplan SL, Grumbach MM. Acute N- Methyl D, L - Aspartate administration stimulates the luteinizing hormone pulse generator in the ovine fetus. Horm Res 1999; 51(1): 25-30.
7. Scacchi P, Carbone S, Szwarcfarb B, Wuttke W, Moguilevsky JA. Interaction between gabaergic and serotonergic systems with excitatory amino acid neurotransmission in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in prepubertal female rats. Brain Res Dev Brain Res 1998; 105(1): 51-8.
8. Minegishist KH, Tano M, Kameda T, Hirakawa T, Miyamoto K. Control of FSH receptor mRNA expression in rat granulosa cells by 3,5 - cyclic adenosine monophosphate, activin, and follistatin. Mol Cell Endocrinol 1999; 149 (1-2): 71-77.
9. Brann DW, Mahesh VB. Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid induced surge of gonadotropins in the female rat. Endocrinol 1991; 128(3): 1541-1547.
10. Rodriguez MG. Blockade of the establishment of the sexual inhibition resulting from sexual exhaustion by the coolidge effect. Behav Brain Res 1999; 100(1-2): 25-54.
11. Paxinose G. The rat nervous system. Vol 1 and 2, Academic Press, Australia 1985; 56.

12. Stone SH. Method for obtaining venous blood from the orbital sinus of the rat or mouse. *Science* 1954; 100-119
13. Pinilla T, Sempere M, Aguilar E. Role of excitatory amino acid pathways in control of gonadotropin secretion in adult female rats sterilized by neonatal administration of estradiol or testosterone. *J Reprod Fertil* 1998; 113(1): 53-9.
14. Mahesh VB, Brann DW. Neuroendocrine mechanisms underlying the control of gonadotropin secretion by steroid. *Steroids* 1998; 63(5-6): 253-259.
15. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1994; 15(1): 3-49.
16. Eonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 42(1): 1-11.