

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

سیما شهابی<sup>۱\*</sup>، دکتر علی اکبر مقدمنیا<sup>۲</sup>

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 ترونهای نورآدرنرژیک مرکزی (NA) مستقر در هسته لوکوس سرلوتوس در ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH)، بررسی گردید.

**مواد و روشها:** جهت انجام آزمایشها، از موشی‌ای صحرائی بالغ نر استفاده گردید. ابتدا به روش استریوتاکسی، در هسته لوکوس سرلوتوس یک کانول راهنمای نصب شد. پس از گذشت مدت زمان لازم بعد از عمل جراحی به حیوانات کانول گذاری 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 ۴ DSP-4 صورت گرفت و بعد از گذشت یک هفت جهت تخریب کامل ترونهای نورآدرنرژیک، گلوتامات را درون هسته، تزریق کرده و بعد از ده دقیقه نمونه خوبی 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 ترونهای 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

گونادوتروپین‌ها در هیپotalاموس 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

گزارشات متعدد حاکی از نقش اسیدهای آمینه تحریکی، (Excitatory Amino Acid ، EAA) در تنظیم اعمال نوروآندوکرین می‌باشد. بطوریکه نقش اساسی را در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، از جمله هورمون محرکه فولیکولی (FSH) دارند (۱۰). براساس مطالعات انجام شده، محل اثر اسیدهای آمینه تحریکی در تنظیم ترشح

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

■ روش کار: قبل از انجام آزمون مورد نظر، ابتدا به روش استریوتاکسی، یک کانول راهنمای جهت تزریق داروها در هسته لوکوس سرلوئوس بر روی جمجمه حیوان نصب شد. برای این کار، ابتدا حیوانات را با تزریق داخل صفاتی (I.P) پنتوباریتال سدیم به میزان  $45\text{mg/kg}$ ، بیهوش کرده و سپس با استفاده از اطلس پاکسینوز کانول راهنمای را با مشخصات  $\text{AP}=-10/0\text{ml}$   $\text{DV}=6\text{ml}$   $\text{L}=1/58\text{ml}$  (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 راهنمای قرار می‌گرفت، صورت گرفت. ۱۰ الی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق دارو به هسته، خونگیری از گوشه چشم حیوان صورت می‌گرفت (۱۱) و سپس سرم از طریق ساتریفوژ نمونه‌های بدست آمده با  $300\times$  دور در دقیقه تهیه نموده و تا زمان استفاده برای تعیین مقدار هورمون محرکه فولیکولی در سرمای  $20^\circ\text{C}$ - درجه سانتیگراد، نگهداری می‌کردیم.

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

به منظور تعیین صحت کانول گذاری بعد از اتمام هر آزمون ماده قرمز خشنی (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  $10\%$  قرار داده شد. برشهای بافتی از بافت ثابت شده مغز، تهیه و محل تزریق رنگ در

بطن مغز موجب تحریک ترشح گونادوتروپین‌ها می‌شود (۴) و ثالثاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی از قبیل آسپارتات و گلوتامات با غلظتهای بالا در هسته‌های مختلف هیپotalامیک موجب ترشح گونادوتروپین‌ها شده است (۵). بنابراین اسیدهای آمینه تحریکی، نقش خود را در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، از طریق تحریک ترشح GnRH ایفا می‌کنند (۶). این اثر خود را بر روی ترشح GnRH در هسته قوسی که محل پایانه‌های اعصاب حاوی GnRH می‌باشد (۷) و منطقه پراپتیک که محل اجسام سلولی اعصاب حاوی GnRH می‌باشد، اعمال می‌نماید (۸). وجود گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی بر روی اعصاب حاوی GnRH ممکن است دال بر اثر مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی در تحریک این اعصاب و ترشح محتابات آن یعنی GnRH باشد (۹ و ۱۰).

لذا در این مطالعه، تلاش برآن است تا با تزریق مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی به هسته لوکوس سرلوئوس و اندازه‌گیری میزان هورمون محرکه فولیکولی (FSH) سرم خون، جزئیات ارتباط دو سیستم نورآدرنرژیک مرکزی و اسیدهای آمینه تحریکی در ترشح گونادوتروپین‌ها، هرچه بیشتر روش شود. همچنین اثر تجویز اسیدهای آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH) از طریق سیستم نورآدرنرژیک مرکزی (هسته لوکوس سرلوئوس) بررسی شده که می‌تواند 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  $150\text{-}250\text{ g}$  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.

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

#### یافته‌ها

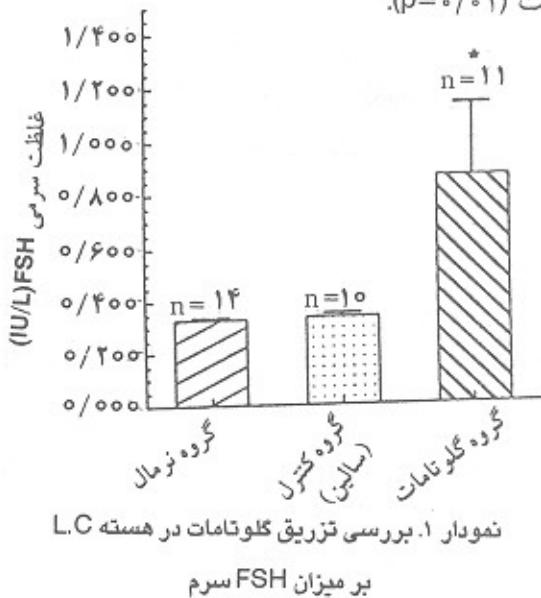
بر اساس نتایج حاصل غلظت سرمی هورمون محرکه فولیکولی در موش بالغ نر، در محدوده  $0.26 \text{ IU/L} \pm 0.04$  بود (جدول ۱).

جدول ۱. تغییرات غلظت سرمی FSH در گروههای

مختلف مورد بررسی موش‌های صحرائی

غلظت سرمی FSH (IU/L)	گروههای مورد آزمایش
$0.3279 \pm 0.011$	نرمال (n=۱۴)
$0.3380 \pm 0.016$	سالین (کنترل) (n=۱۰)
$0.8627 \pm 0.027$	گروه Glu (n=۱۱)
$0.3211 \pm 0.008$	گروه Glu & DSP-4 (n=۹)

تزریق گلوتامات در داخل هسته لوکوس سرلوئوس 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 معنی‌دار داشت ( $p = 0.02$ ).



زیر میکروسکوپ ردبایبی می‌شد. نتایج بدست آمده از آزمایشاتی که در آنها کانول راهنما به طرز صحیح در هسته لوکوس سرلوئوس قرار نگرفته بود، حذف می‌شد. غلظت هورمون محرکه فولیکولی در سرمهای فریز شده با استفاده از کیت آزمایشگاهی I125 FSH-IRMA و با حساسیت  $1 \text{ IU/L}$  به روش IRMA اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه گروههای آزمایشی از حیوانات در نظر گرفته شده به ترتیب ذیل می‌باشند:

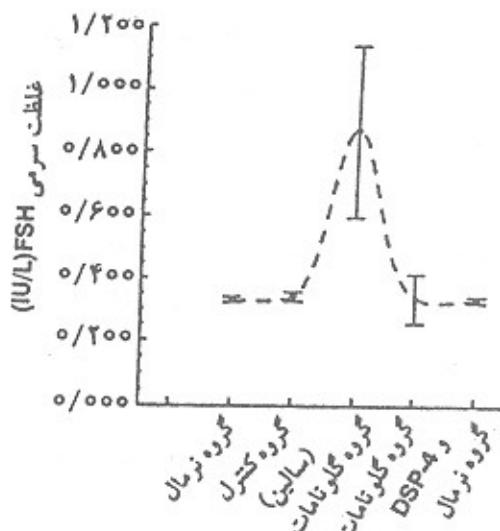
■ گروه نرمال: گروهی که هیچ عمل جراحی بر روی آنها صورت نگرفته است، از این گروه خون‌گیری انجام و میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم آنها اندازه‌گیری شد.

■ گروه کنترل: در این گروه موش‌های کانول‌گذاری شده بعد از بهبودی از جراحی انتخاب می‌شدند. سپس سالین 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 ۲۰ میکرограм در ۱۰ میکرولیتر توسط سرنگ هامیلتون و رابط پلی‌اتیلنی مرتبط با کانول تزریقی به درون هسته لوکوس سرلوئوس از طریق کانول هدایتی تزریق می‌شد و بعد از ده دقیقه خون‌گیری انجام می‌گرفت. و میزان هورمون محرکه فولیکولی سرم اندازه‌گیری می‌شد.

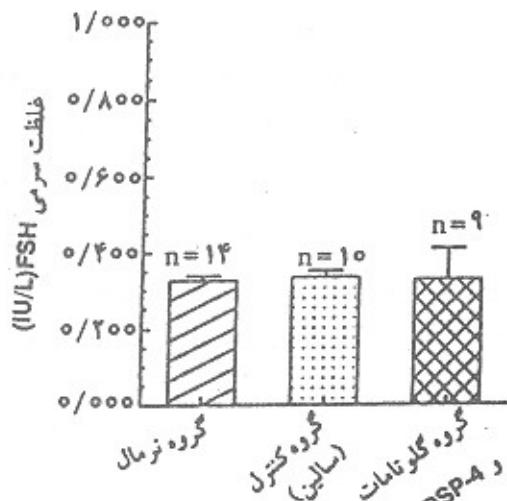
■ گروه گلوتامات ۴: در این گروه ابتدا به روش استریوتاکسی، DSP-4 که یک نوروتوكسین انتخابی نرونهاي نورآدرنرژيک می‌باشد را به میزان ۵۰ میکرограм در ۱ میکرولیتر، بوسیله سرنگ هامیلتون ۵ تا ۷ روز به منظور تخریب کامل نرونهاي نورآدرنرژيک، گلوتامات به میزان ۲۰ میکرограм در ۱۰ میکرولیتر به هسته لوکوس سرلوئوس از طریق کانول راهنما تزریق کردیم و بعد از ۱۰ دقیقه خون‌گیری صورت گرفت و میزان FSH سرم اندازه‌گیری شد.

■ آنالیز آماری: برای مقایسه گروههای آزمایش از تست



نمودار ۴. نقش سیستم نورآدرنرژیک (هسته L.C) بر اثرات تحریکی گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته

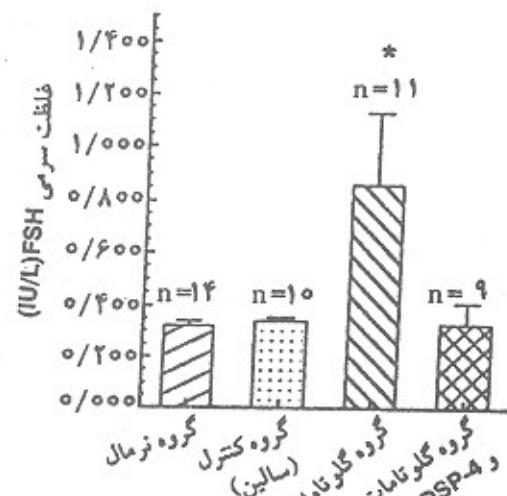
نمودار ۲ عدم وجود اختلاف معنی دار در میزان هورمون FSH خون در گروهی که هسته، تخریب شیمیایی شده با گروه کنترل و گروه نرمال را نشان می دهد. پس از ۷ روز قرار گرفتن اعصاب نورآدرنرژیک هسته لوكوس سرلوتوس در معرض توروتوكسین DSP-4، این هسته تخریب شد که موجب حذف کامل اثر تحریکی دی سدیم گلوتامات بر ترشح FSH گردید (نمودار ۳ و نمودار ۴).



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

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

وجود گیرنده های اسیدهای آمینه تحریکی در روی اعصاب حاوی GnRH نیز حاکی از دخالت اسیدهای آمینه تحریکی GnRH و همچنین ترشح گونادوتروپین ها می باشد (۱۴). بطوریکه حساسیت منطقه پراپتیک ( محل جسم سلولی نرون های حاوی GnRH) به NMDA<sup>۱</sup> که نوعی اسید آمینه تحریکی می باشد و حساسیت منطقه برجستگی میانی و هسته قوسی ( محل پایانه های نرون های حاوی GnRH) به آگونیست های غیر NMDA که نوعی دیگر از اسیدهای آمینه تحریکی هستند، مشاهده شده است (۱۵). علی رغم 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 ۳. نقش سیستم نورآدرنرژیک هسته لوكوس سرلوتوس بر اثرات گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته

اسید آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم عصب‌دهی هسته لوكوس سرلوتوس که جایگاه اصلی سیستم نورآدرنرژیک مرکزی است، می‌باشد.

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

بنابراین این امکان وجود دارد که با تحریک هسته لوكوس سرلوتوس از طریق گلوتامات، اعصاب خروجی از هسته لوكوس سرلوتوس که به طرف هیپوپاتالاموس می‌روند و ترشح توأم (colocalization) نوراپی‌نفرين گلوتامات را بر روی هیپوپاتالاموس به همراه دارند<sup>(۱)</sup> موجب تحریک نرونهاي حاوي GnRH در هیپوپاتالاموس شده و در نتیجه موجب افزایش ترشح هورمون محرکه فولیکولی شده است. همچنین تأثیر DSP-4 که یک نوروتوکسین اختصاصی برای سیستم نورآدرنرژیک می‌باشد 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 نوراندوکرین مشخص کرده بطوریکه اثر تحریکی گلوتامات بر ترشح هورمون محرکه فولیکولی بعد از تخریب این هسته، حذف شد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که :

- ۱- هسته لوكوس سرلوتوس یکی از مناطق مهم در تنظیم ترشح GnRH و FSH می‌باشد و می‌توان بعنوان یک هسته مرکزی در کنترل ترشح گونادوتروپین‌ها از آن نام برد.
- ۲- اسیدهای آمینه تحریکی بخشی از اثرات خود را برای تحریک ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم نورآدرنرژیک مرکزی موجود، در هسته لوكوس سرلوتوس، اعمال می‌نماید.

و تحریک سلولهای GnRH در هیپوپاتالاموس وجود دارد. بطوریکه مطالعات انجام شده بر روی موشهای بالغ نر و ماده علاوه براینکه اثر فعالیت C-Fos (C-Fos) زن تولید کننده پروتئین FOS می‌باشد که به عنوان ردیابهای سلولی برای فعالیت عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد، متأثر از NMDA را در مناطق هسته قوسی، برجستگی میانی،<sup>(۱)</sup> OVLت، که محل جسم سلولی نرونهاي حاوي GnRH می‌باشند را نشان داده‌اند، این اثر در مناطق دیگری مانند کورتکس مغز و همچنین در هسته لوكوس سرلوتوس که به عنوان جایگاه اصلی سیستم نورآدرنرژیک مرکزی می‌باشد، نیز مشاهده شده است<sup>(۱۵)</sup>. این مطالعات روشنگر اثرات اسیدهای آمینه تحریکی در نقاط مختلف CNS، در داخل هیپوپاتالاموس بر روی ترشح گونادوتروپین‌ها، بالاخص هورمون محرکه فولیکولی می‌باشند.

بررسی این مطالعات و همچنین وجود ارتباط آناتومیکی بین هسته لوكوس سرلوتوس و برجستگی میانی و مناطق دیگر هیپوپاتالاموس<sup>(۱۵)</sup>، این تصور را پیش می‌آورد که اسیدهای آمینه تحریکی ممکن است از طریق سیستم نورآدرنرژیک هسته لوكوس 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  $4-26 \text{ IU/L}$  بوده است.

گلوتامات به عنوان یکی از واسطه‌های عصبی شناخته شده که بیشتر از بقیه اسیدهای آمینه تحریکی در بافت مغز یافت شده<sup>(۱۶)</sup> به عنوان یک مداخله‌گر تنظیمی در سیستم نوراندوکرین مشخص شده است<sup>(۵)</sup>.

نتایج حاصله در این تحقیق بعد از تزریق گلوتامات به هسته لوكوس سرلوتوس در موش صحرایی نر افزایش معنی دار در میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم خون را نشان می‌دهد ( $P=0.02$ ) که بیانگر اثر تحریکی این

## تقدیر و تشکر

کردنایچ و خانم فاطمه پاکزاد و همچنین معاونت امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل تأمین اعتبار این طرح تحقیقاتی تقدیر و تشکر می‌شود.

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر شهربانو عربان استاد دانشگاه تریت معلم بخاطر همکاری صمیمانه و زحمات آقای قلی اسدالهزاده متصدی آزمایشگاه و آقای فرامرز

\*\*\*\*\*

**References**

1. Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ. Norepinephrine neurons 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, Rawlings NC. Nitric oxide regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifers. *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. Minegishi 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.