

## مقاله پژوهشی

## نقش میانجیگری نوروپپتید FF در هیپوفازی القایی توسط سیستم ملانوکورتینی در جوجه های نوزاد نژاد گوشتی

یاسمن موسی دوست، مرتضی زنده دل\*، مینا خدادادی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

پذیرش: ۹ خرداد ۱۳۹۹

دریافت: ۴ اردیبهشت ۱۳۹۹

## چکیده

**زمینه و هدف:** پپتید وابسته به آرژنین-فنیل آلانین-آمید ۳- انسانی پپتیدی متعلق به خانواده پپتیدهای آر اف آمیده (آرژنین-فنیل آلانین) است که پیشتر نقش آن در تنظیم اشتها پستانداران بواسطه تحریک گیرنده های نوروپپتید اف اف به اثبات رسیده است. مطالعه حاضر به بررسی اثرات گیرنده NPPF بر تنظیم اخذ غذا و ارتباط آن با سیستم ملانوکورتینی در جوجه های نوزاد می پردازد.

**روش ها:** تعداد ۲۲۰ جوجه نر نوزاد نژاد گوشتی (راس ۳۰۸) در ۵ آزمون، و هر آزمون در چهار گروه شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار دسته بندی شدند (۱۱ جوجه در هر گروه). میزان اخذ غذای تجمعی در جوجه های ۵ روزه در زمان های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق داخل بطنی مغزی داروها اندازه گیری و تجزیه و تحلیل شد.

**یافته ها:** آگونیست گیرنده MC3R (γ1-MSH) ۵ و ۱۰ پیکومول و آگونیست گیرنده MC4R (PG-931) ۲۵ و ۵۰ پیکومول اخذ غذا را نسبت به گروه کنترل در همه زمان های آزمایش کاهش دادند ( $p < 0/05$ ). در حالیکه تزریق ۸ و ۱۶ نانومول آنتاگونیست گیرنده NPPF (RF9)، سبب افزایش اخذ غذا نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان آزمایش شد ( $p < 0/05$ ). تزریق همزمان RF9 و γ1-MSH تغییر معنی داری بر هیپوفازی القایی توسط γ1-MSH نداشت ( $p \geq 0/05$ ). در حالیکه تزریق RF9 به همراه PG-931 هیپوفازی القایی توسط PG-931 را به طور معنی داری در همه زمان های آزمایش تخفیف داد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج احتمالاً اثرات هیپوفازی MC4R بر اخذ غذا در جوجه های نوزاد نژاد گوشتی از طریق گیرنده های NPPF میانجی گری می شود.

**واژه های کلیدی:** اخذ غذا، جوجه، تزریق داخل بطنی مغزی، ملانوکورتین، نوروپپتید FF

## مقدمه

اتصال به گیرنده های اختصاصی خود و یا با اثر بر آزادسازی سایر میانجی های عصبی در کنترل اشتها نقش دارند. تا به امروز ۵ گروه از پپتیدهای خانواده آر اف-آمیده<sup>۱</sup> شناخته شده اند. پپتیدهای متعلق به این خانواده همگی به توالی آرژنین-فنیل آلانین در انتهای کربوکسیل ختم می شوند و شامل ۱- گروه نوروپپتید اف اف<sup>۲</sup> - گروه پپتید آزادکننده پرولاکتین<sup>۳</sup> - گروه ال پی ایکس آر اف-آمیده<sup>۴</sup> - گروه

به طور کلی تنظیم میزان مصرف غذا در پرندگان بوسیله مکانیسم های هورمونوستاتیک پیچیده و در سطوح کنترلی مختلف اجرا می شود و در این راستا عوامل مختلفی نظیر عوامل خارجی (از جمله شرایط محیطی و رژیم غذایی) و داخلی مانند عوامل گوارشی، هورمونی و متابولیکی دخیل هستند [۱]. کنترل اشتها در سیستم اعصاب مرکزی توسط میانجی ها و مدارهای عصبی انجام می گیرد و در مغز پرندگان و پستانداران پپتیدهای متنوعی در تنظیم اخذ غذا و کنترل وزن بدن مؤثر هستند که این نوروپپتیدها در نواحی مختلفی از مغز حضور داشته و با

<sup>1</sup> RFamide peptide

<sup>2</sup> Neuropeptide FF

<sup>3</sup> LPXRFamides (RFRPs)

همین گیرنده‌ها اخذ غذا را در جوجه‌های نوزاد گوشتی افزایش داده است [۶].

در مطالعه‌ای که اخیراً بر روی RFRP-3 انجام گرفته است، نشان داده شد که این نوروپپتید احتمالاً بواسطه بازکردن کانال‌های پتاسیمی سبب مهار نورون‌های پیش اپیوملانوکورتینی<sup>۹</sup> (POMC) و معکوس کردن اثرات کیس پپتین در موش شده است [۷]، بنابراین احتمال وجود تداخل تنظیمی در ارتباط با اثر RFRP-3 و سیستم ملانوکورتینی در ناحیه هیپوتالاموس وجود دارد. با توجه به مطالب فوق و اثبات حضور RFRP-3 در نواحی دخیل در کنترل اخذ غذا در پرندگان و همچنین ارتباط بین سیستم ملانوکورتینی در نواحی مختلف مغز در تنظیم رفتارهای فیزیولوژیک، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات گیرنده NPFF بر اخذ غذای تجمعی در جوجه‌ها و همچنین بررسی ارتباط آن با سیستم ملانوکورتینی در جوجه‌های نوزاد نژاد گوشتی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

این مطالعه بر روی ۲۲۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه نژاد راس ۳۰۸ (شرکت ماهان، تهران، ایران) انجام شد. جوجه‌ها در دمای  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  و رطوبت  $50 \pm 2\%$  درصد و نور ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذا (جیره استارتر استاندارد حاوی ۲۱٪ پروتئین خام و ۲۸۵۰ کیلوکالری به ازای هر کیلوگرم انرژی قابل متابولیسه، شرکت چین، تهران، ایران) نگهداری شدند. جنبه‌های اخلاقی کار با حیوانات با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (مؤسسه ملی سلامت ایالات متحده آمریکا) و همچنین مطابق با قوانین مصوب توسط انجمن حمایت از حیوانات دولت جمهوری اسلامی ایران انجام گرفته است. در ابتدا جوجه‌ها به مدت ۳ روز بصورت گروهی و سپس به مدت ۲ روز در قفس‌های انفرادی نگهداری شدند. برای انجام آزمون‌ها جوجه‌ها همواره تا سه ساعت قبل از انجام تزریقات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و اما سه ساعت قبل از انجام اولین تزریق از اخذ غذا محروم شدند ولیکن در تمام طول آزمایش به آب تازه دسترسی داشتند. کلیه مراحل نگهداری، جابجایی، تزریق و انجام آزمایش بر روی جوجه‌ها

کیس پپتین<sup>۴</sup> و ۵- پروگلوتامیلین آر-اف-آمید پپتید<sup>۵</sup> هستند که همگی آن‌ها دارای اعمال فیزیولوژیک متعددی در مغز پستانداران می‌باشند. از جمله مهمترین این وظایف، نقش آن‌ها در بلوغ، تولیدمثل و عملکرد تنظیمی آن‌ها در رفتارهای تغذیه‌ای می‌باشد [۲]. برخی از این نوروپپتیدها اثرات ارکسیژنیک و برخی دیگر اثرات آنورکسیژنیک دارند که در این میان دو پپتید به نام های آر اف آر پی-۱ (RFRP-1) و آر اف آر پی-۳ (آرژنین-فنیل آلانین-آمید-۳-انسانی؛ RFRP-3)<sup>۶</sup> هستند که به ترتیب نوروپپتید اس اف<sup>۷</sup> (NPSF) و نوروپپتید وی اف<sup>۸</sup> (NPVF) نیز نامیده می‌شوند. مطالعات مختلف نشان داده اند که این پپتیدها در انسان، گاو، موش سوری (فقط RFRP-3)، موش صحرائی، همستر و گوسفند توسط ژن NPVF کد می‌شوند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که RFRP-3 ارتولوگ هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) در پستانداران می‌باشد [۳]. اثرات بی‌اشتهایی کوتاه مدت ناشی از تزریق NPVF در پرندگان اخیراً مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل از آن نشان‌دهنده همبستگی این اثرات با تغییرات رفتاری برخاسته از هسته های هیپوتالاموسی در مغز جوجه می‌باشد [۴].

یکی از سیستم های نوروترانسمیتری مغز که نقش مؤثری در کنترل اشتها دارد، سیستم ملانوکورتینی است. تاکنون ۵ نوع گیرنده ملانوکورتینی (MC1R-MC5R) شناسایی شده‌اند که در فرآیندهای مغزی از جمله تنظیم تعادل انرژی، تنظیم حرارت بدن و یادگیری نقش دارند. اما در این میان تنها MC3R و MC4R دارای نقش تنظیمی برجسته در ارتباط با کنترل اشتها در پستانداران و پرندگان می‌باشند. پراکندگی این دو گیرنده بیشتر در نواحی هیپوتالاموسی (در محل هسته‌های کمانی، شکمی میانی و پاراونتریکولار هیپوتالاموس که از مهمترین مراکز تنظیم اخذ غذا در پستانداران و پرندگان هستند) است. مطالعاتی که بر روی کنترل اخذ غذای ناشی از تزریق داخل بطن مغزی آگونیست MC3R و MC4R در پستانداران انجام شده، کاهش اخذ غذا بواسطه تحریک این گیرنده ها را نشان می‌دهد [۵]. همچنین تزریق داخل بطنی مغزی آنتاگونیست

<sup>4</sup> Kisspeptin

<sup>5</sup> Pyroglutamylated RFamide peptide QFRP

<sup>6</sup> Arginine-phenylalanine-amide-related peptide-3

<sup>7</sup> Neuropeptide SF (NPSF)

<sup>8</sup> Neuropeptide VF (NPVF)

<sup>9</sup> Pro-opiomelanocortin

مورد آنالیز قرار گرفت چراکه رنگ اوانس بلو ۰/۱٪ در نرمال سالین ۰/۸۵٪ بعنوان شاهد تشخیص تزریق صحیح در گروه کنترل استفاده شد و دیگر داروهای مورد استفاده یا در این ترکیب حل شده و یا توسط آن رقیق شده بودند. حجم تزریق در هر گروه ۱۰ میکرولیتر بود و در هر آزمون جوجه‌ها بمدت ۳ ساعت قبل از آزمایش از غذا محروم شدند (FD3)<sup>۱۳</sup> و بعد از تزریق به قفس بازگردانده شده، بصورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. سپس مقدار غذای تجمعی برای هر جوجه در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق بر مبنای درصدی از وزن بدن اندازه‌گیری شد. تمامی فرآیندهای مذکور از ساعت ۸ صبح تا ۳:۳۰ بعدازظهر در محل آزمایشگاه اختصاصی فیزیولوژی در ساختمان جناب آقای دکتر رستگار در محل دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد. در پایان لازم به ذکر است که اخذ غذا بعنوان درصدی از وزن بدن بیان می‌شود تا اثر تفاوت وزن بین جوجه‌ها بر میزان اخذ غذا به حداقل برسد.

### طراحی آزمون و اندازه‌گیری اخذ غذای تجمعی

در آزمایش اول، گروه کنترل (الف) تزریق داخل بطنی مغزی محلول کنترل، در گروه (ب) ۵/۲ پیکومول ۱-MSH، گروه (ج) ۵ پیکومول ۱-MSH و در گروه (د) ۱۰ پیکومول ۱-MSH انجام شد. در آزمایش دوم گروه (الف) با محلول کنترل، گروه (ب) ۵/۱۲ پیکومول PG-931، گروه (ج) ۲۵ پیکومول PG-931 و گروه (د) ۵۰ پیکومول PG-931 مورد تزریق قرار گرفتند. در آزمایش سوم گروه (الف) محلول کنترل را به صورت تزریق داخل بطنی مغزی دریافت کردند و گروه (ب) ۵/۰ نانومول RF9، گروه (ج) ۱ نانومول RF9 و گروه (د) ۲ نانومول RF9 تزریق شد. در آزمایش چهارم گروه (الف) با محلول کنترل، گروه (ب) ۵/۰ نانومول RF9، گروه (ج) ۱۰ پیکومول ۱-MSH و در گروه (د) ۵/۰ نانومول RF9 و ۱۰ پیکومول ۱-MSH همزمان تزریق شد. در آزمایش پنجم گروه (الف) با محلول کنترل، گروه (ب) ۵/۰ نانومول RF9، گروه (ج) ۵۰ پیکومول PG-931 و در گروه (د) ۵/۰ نانومول RF9 و ۵۰ پیکومول PG-931 همزمان بصورت تزریق داخل بطنی مغزی تزریق شد.

<sup>13</sup> Food deprived 3 hours

مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ایالات متحده آمریکا (شماره چاپ ۸۵-۲۳، ویرایش شده در سال ۱۹۹۶)<sup>۱۰</sup> و همچنین قوانین مربوط به نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دولت جمهوری اسلامی ایران و بیانیه هلسینکی انجام شد.

### داروهای مصرفی

تمامی داروهای مصرفی (سیگما-آمریکا) شامل ۱-MSH-۱ (آگونیست MC3R)، RF9<sup>۱۱</sup> (آنتاگونیست گیرنده نوروپپتید FF) و PG-931 (آگونیست MC4R) در دی متیل سولفوکساید<sup>۱۲</sup> حل شده و سپس با سالین ۰/۸۵٪ حاوی اوانس بلو ۰/۱٪ به نسبت ۱:۲۵۰ رقیق شدند. لازم به ذکر است که دی متیل سولفوکساید با غلظت مصرفی در این مطالعه دارای اثرات سمیت سلولی نمی‌باشد [۸]. در تمامی گروه‌های آزمایشی از سرم فیزیولوژی به همراه اوانس بلو ۱/۰٪ در تزریق داخل بطنی مغزی بعنوان گروه کنترل استفاده شد.

### روش تزریق داخل بطنی مغزی

به منظور انجام این مطالعه، جوجه‌ها در ۵ گروه ۱۱ تایی به صورت تصادفی دسته‌بندی شدند. جهت تزریق داخل بطنی مغزی در جوجه‌ها، سر جوجه هوشیار توسط یک دستگاه اکریلیک که زاویه نوک آن ۴۵ درجه می‌باشد نگه داشته شد، درحالی‌که سطح مجسمه موازی با سطح میز کار بود. یک سوراخ در کلیشه دستگاه تعبیه شده بود که بلافاصله بر روی مجسمه در ناحیه بطن راست قرار می‌گرفت. سپس از طریق سوراخ ایجاد شده در بطن مغز، مواد و داروهای مورد نظر با استفاده از سرنگ هامیلتون (هامیلتون - سوئیس) تزریق شدند [۹]. لازم به ذکر است که سر سوزن تنها به اندازه ۴ میلی‌متر در پوست و جمجمه فرو می‌رود و این پروسه در جوجه‌ها استرس فیزیولوژیکی ایجاد نمی‌کند [۱۰]. در پایان آزمایش، جوجه‌ها به روش پیچاندن سریع گردن، یوتانایز شده و محل تزریق مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله تنها داده‌های مربوط به جوجه‌هایی که رنگ آبی در بطن جانبی مغز آن‌ها مشهود بود

<sup>10</sup> Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the National Institutes of Health, USA (publication No. 85-23, revised 1996)

<sup>11</sup> Antagonist of the NPPF receptors

<sup>12</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)

## روش ارزیابی آماری

در این مطالعه آنالیز داده ها بوسیله نرم افزار SPSS14 (نسخه ۱۶/۰۰) انجام شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار میان گروه‌های آزمایشی از روش تحلیل واریانس دوطرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام مقایسه‌ها سطح  $p < 0.05$  به عنوان معیار اختلاف معنی دار مد نظر بود. نمودارها در نرم افزار سیگما پلات (نسخه ۱۴/۰۰) رسم شد.

## یافته‌ها

اثرات گیرنده نوروپپتید FF بر اخذ غذای تجمعی و ارتباط آن با سیستم ملانوکورتینی در جوجه‌های نوزاد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در نمودارهای ۱-۵ قابل مشاهده است. در آزمون نخست متعاقب تزریق داخل بطنی مغزی،  $5/2$  پیکومول  $\gamma 1$ -MSH به عنوان آگونیست MC3R در زمان‌های  $30, 60$  و  $120$  دقیقه پس از تزریق، هیچ تغییر معنی داری در اخذ غذای تجمعی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ( $p \geq 0.05$ ). در حالیکه بدنبال تزریق داخل بطنی مغزی دوزهای  $5$  و  $10$  پیکومول از  $\gamma 1$ -MSH، به طور معنی داری اخذ غذا در هر سه زمان آزمایش و در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ( $p < 0.05$ )، نمودار ۱). آنالیز واریانس دوطرفه نشان دهنده اثر معنی دار دوز [ $F(3, 40 = 16.07/3, p < 0.001)$ ] و زمان [ $F(2, 80 = 519.0/2, p < 0.001)$ ] و برهمکنش معنی داری بین فاکتورهای نوع درمان و زمان می باشد [ $F(6, 80 = 51/8, p < 0.001)$ ].

در آزمون دوم، تزریق PG-931 با دوز  $5/12$  پیکومول در همه زمان‌های آزمایش اثر معنی داری بر اخذ غذا در مقایسه با گروه کنترل نداشت ( $p \geq 0.05$ ) در حالیکه در دوزهای بالاتر تزریق PG-931 ( $25$  و  $50$  پیکومول) به طور معنی داری در هر سه دوره اخذ غذا کاهش یافت ( $p < 0.05$ )، نمودار ۲).

آنالیز واریانس دوطرفه نشان دهنده اثر معنی دار دوز [ $F(3, 40 = 986/7, p < 0.001)$ ] و زمان [ $F(2, 80 = 3862/8, p < 0.001)$ ] و برهمکنش معنی داری بین فاکتورهای نوع درمان و زمان می باشد [ $F(6, 80 = 47/3, p < 0.001)$ ].

در آزمون سوم، تزریق داخل بطنی مغزی RF9 با دوز  $4$  نانومول تأثیر معنی داری بر دریافت غذا در مقایسه با گروه

کنترل در زمان‌های آزمایش نداشت ( $p \geq 0.05$ ). اما متعاقب تزریق  $8$  و  $16$  نانومول RF9 به عنوان آنتاگونیست گیرنده نوروپپتید FF اخذ غذا در دقایق  $30$ ،  $60$  و  $120$  پس از تزریق بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $p < 0.05$ )، نمودار ۳).

آنالیز واریانس دوطرفه نشان دهنده اثر معنی دار دوز [ $F(3, 40 = 1083/0, p < 0.001)$ ] و زمان [ $F(2, 80 = 4294/2, p < 0.001)$ ] و برهمکنش معنی داری بین فاکتورهای نوع درمان و زمان می باشد [ $F(6, 80 = 47/1, p < 0.001)$ ].

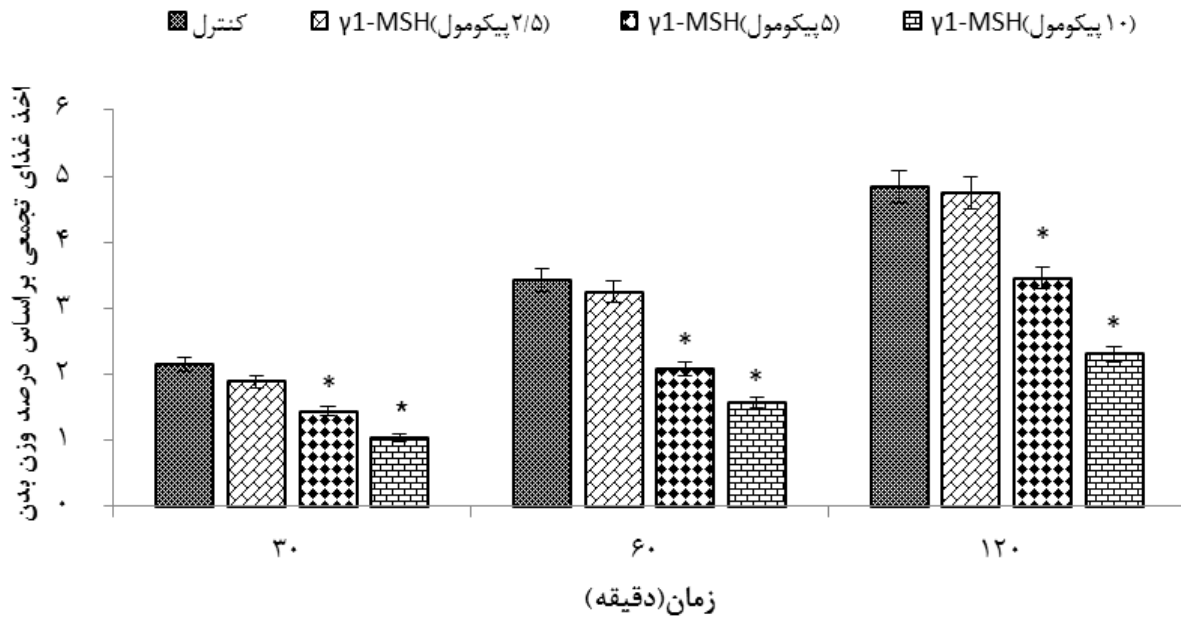
در آزمون چهارم، پس از تزریق داخل بطنی مغزی دوز بی اثر RF9 ( $4$  نانومول) تغییر معنی داری در اخذ غذا در مقایسه با گروه کنترل در دوره‌های زمانی مختلف مشاهده نشد ( $p \geq 0.05$ ). اما تزریق  $\gamma 1$ -MSH با دوز  $10$  پیکومول توانست موجب کاهش معنی داری در اخذ غذا در زمان‌های  $30$ ،  $60$  و  $120$  دقیقه پس از تزریق در مقایسه با گروه کنترل شود ( $p < 0.05$ ). تزریق همزمان RF9 و  $\gamma 1$ -MSH تغییر معنی داری در کاهش اخذ غذای القایی توسط  $\gamma 1$ -MSH ایجاد نکرد ( $p \geq 0.05$ )، نمودار ۴).

نتایج حاصل از آزمون پنجم نشان داد که تزریق دوز بی اثر RF9 ( $4$  نانومول) سبب القای تغییرات معنی داری در اخذ غذای تجمعی در مقایسه با گروه کنترل در دوره‌های زمانی  $30$ ،  $60$  و  $120$  دقیقه در جوجه‌ها نشده است ( $p \geq 0.05$ ). در حالیکه تزریق PG-931 ( $50$  پیکومول) به طور معنی داری اخذ غذا را در هر سه دوره زمانی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $p < 0.05$ ). اما نکته قابل توجه این است که تزریق همزمان RF9 و PG-931 اثر هیپوفازی القایی توسط PG-931 را به صورت معنی داری مهار کرد ( $p < 0.05$ )، نمودار ۵).

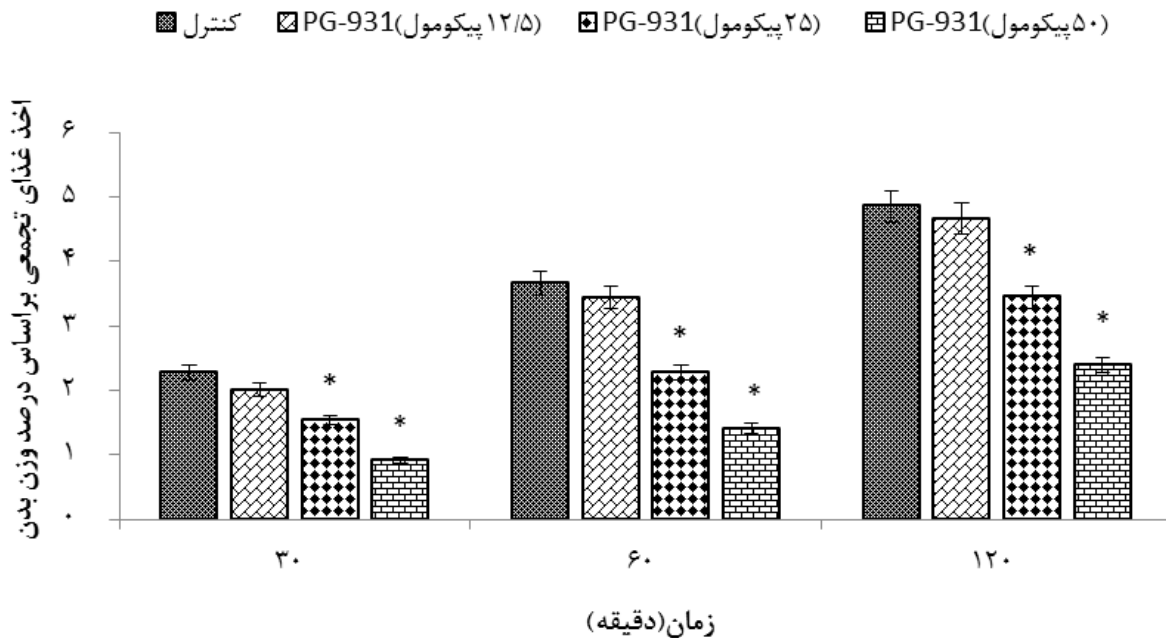
## بحث

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، تزریق داخل بطنی مغزی دوز مؤثر RF9 با مسدود کردن گیرنده‌های NPFF سبب افزایش اخذ غذای تجمعی در جوجه‌های نوزاد گوستی می شود. مطالعات قبلی در این رابطه در پرندگان نشان داده‌اند که نورون‌های متعلق به خانواده GnIH در هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس قرار گرفته و فیبرهای آن‌ها تا مناطق مختلف مغز

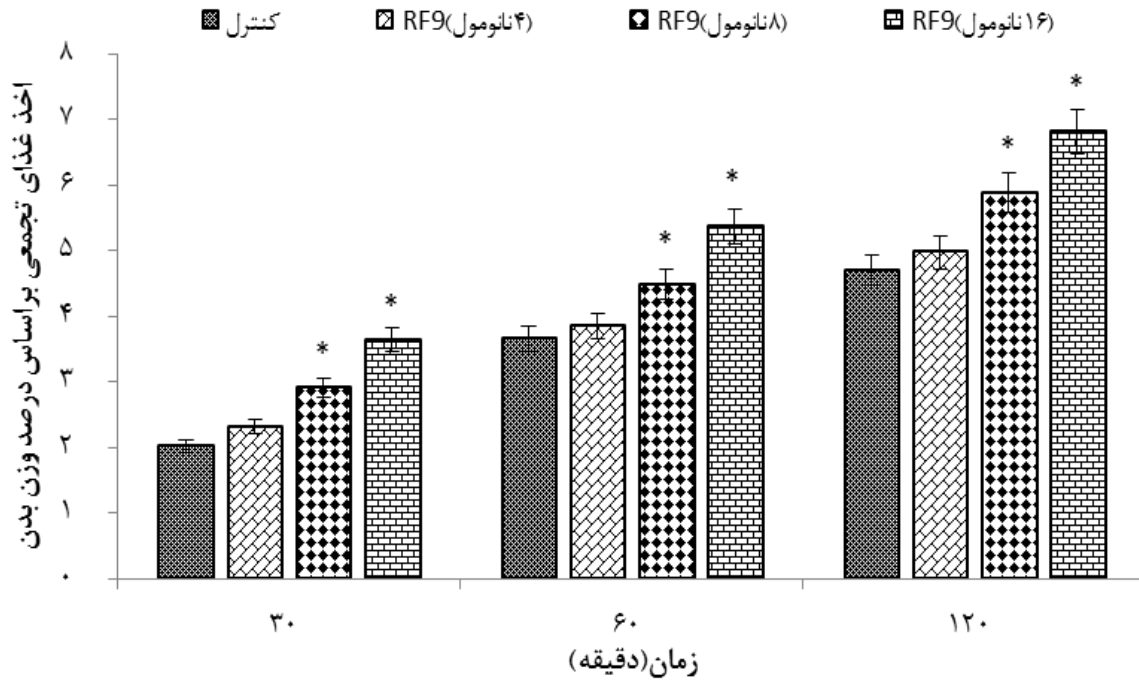
<sup>14</sup>SPSS, Inc., Chicago, IL, USA



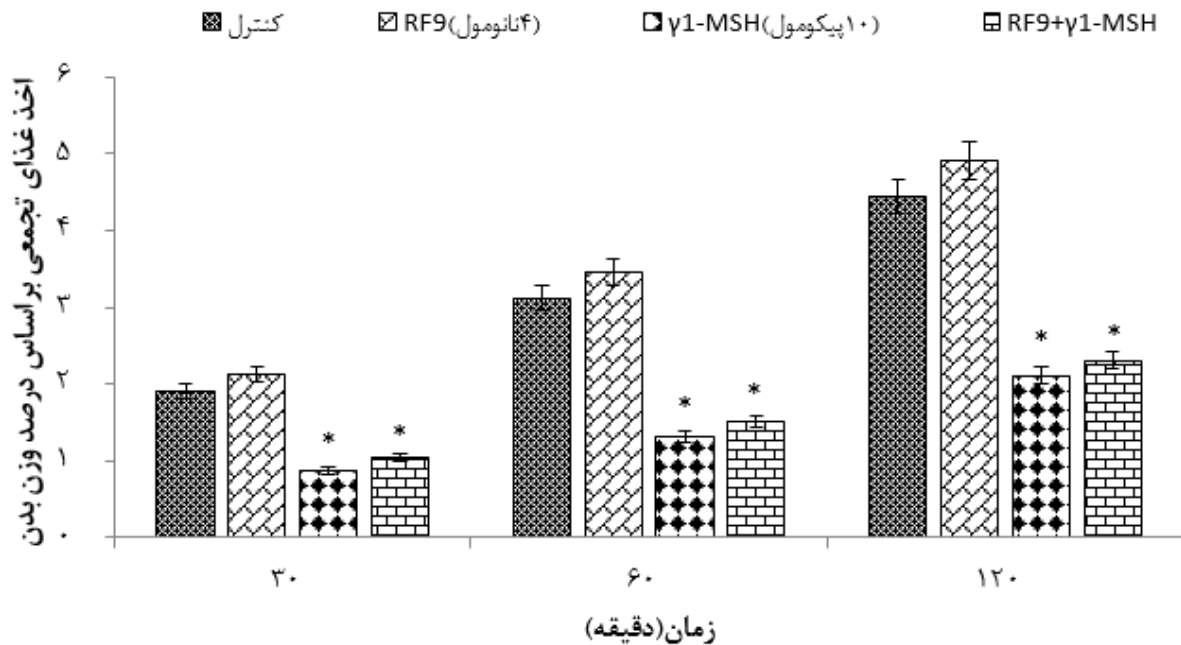
**نمودار ۱-** اثر تزریق داخل بطن مغزی محلول کنترل و دوزهای مختلف  $\gamma 1$ -MSH (۲/۵، ۵ و ۱۰ پیکومول) بر اخذ غذای تجمعی بر اساس درصد وزن بدن در جوجه‌های گوشتی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است و علامت \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در هر زمان است ( $p < 0.05$ ).



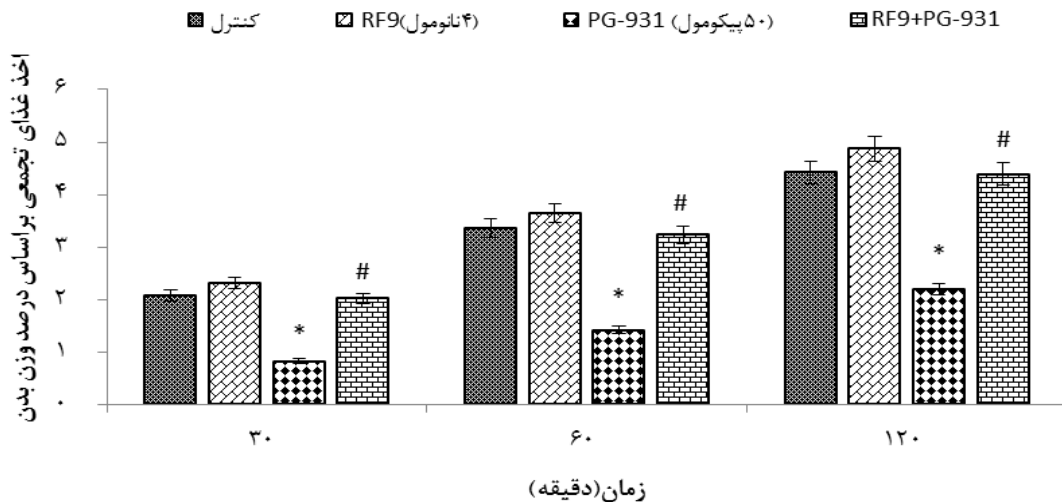
**نمودار ۲-** اثر تزریق داخل بطن مغزی محلول کنترل و دوزهای مختلف PG-931 (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ پیکومول) بر اخذ غذای تجمعی بر اساس درصد وزن بدن در جوجه‌های گوشتی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است و علامت \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در هر زمان است ( $p < 0.05$ ).



**نمودار ۳-** اثر تزریق داخل بطن مغزی محلول کنترل و دوزهای مختلف RF9 (۴، ۸ و ۱۶ نانومول) بر اخذ غذای تجمعی بر اساس درصد وزن بدن در جوجه‌های گوشتی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است و علامت \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در هر زمان است ( $p < 0.05$ ).



**نمودار ۴-** اثر تزریق داخل بطن مغزی محلول کنترل، RF9 (۴ نانومول)،  $\gamma 1$ -MSH (۱۰ پیکومول) و تزریق توأم بر اخذ غذای تجمعی بر اساس درصد وزن بدن در جوجه‌های گوشتی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است و علامت \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در هر زمان است ( $p < 0.05$ ).



**نمودار ۵-** اثر تزریق داخل بطن مغزی محلول کنترل RF9 (۴ نانومول)، PG-931 (۵۰ پیکومول) و تزریق توأم بر اخذ غذای تجمعی بر اساس درصد وزن بدن در جوجه‌های گوشتی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است و علامت \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در هر زمان است ( $p < 0/05$ ) و علامت # نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه PG-931 (۵۰ پیکومول) در هر زمان است ( $p < 0/05$ ).

بی‌اشتهایی (کوتاه مدت تا ۹۰ دقیقه پس از اخذ غذا) در جوجه‌های نژاد گوشتی شده است [۱۳، ۴]. بنابراین شاید بتوان دلیل مشاهدات متفاوت بین گونه پستانداران و پرندگان را به تفاوت موجود در ناحیه تزریق در مغز، تفاوت‌های ژنتیکی زمینه‌ای و همچنین احتمال فعال شدن مدارهای متفاوت عصبی دخیل در تنظیم اخذ غذا در دستگاه اعصاب مرکزی این گونه‌ها نسبت داد [۱۴].

همچنین بر اساس نتایج این مطالعه، تزریق داخل بطنی مغزی دوز مؤثر آنتاگونیست گیرنده‌های NPDF، اخذ غذا را در جوجه‌های نوزاد گوشتی کاهش داد. در همین راستا مطالعه دیگری در جوجه‌های گوشتی، اثرات تزریق داخل بطنی مغزی RFRP-3 انسانی<sup>۲۰</sup> را گزارش کرده است. در این مطالعه تزریق داخل بطن مغزی این پپتید بعنوان آگونیست گیرنده‌های مزبور سبب کاهش کوتاه مدت (تا ۶۰ دقیقه) اخذ غذا شد در حالیکه اثری بر اخذ آب در جوجه‌ها نداشت [۴]. نتایج مطالعه حاضر نیز اثرات هیپوفازیک القایی بواسطه تزریق داخل بطنی مغزی RFRP-3 انسانی را در جوجه‌های گوشتی تأیید کرده و پایداری این اثر هیپوفازیک را تا ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق به اثبات رسانده است. همچنین در مطالعه کلاین<sup>۲۱</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۸، تزریق داخل بطنی مغزی RFRP-3 انسانی

از جمله برجستگی میانی<sup>۱۵</sup>، پالئواستریاتوم آگمنتاتوم<sup>۱۶</sup>، ناحیه سپتال<sup>۱۷</sup> و ناحیه پری‌اپتیک<sup>۱۸</sup> هیپوتاموس کشیده شده‌اند. بیان این نوروها به شکل گسترده‌ای در ناحیه مزنسفال و دیانسفال مغز بلدرچین نیز گزارش شده است. از طرفی پپتیدهای مرتبط با هورمون مهارکننده گونادوتروپین<sup>۱۹</sup> (RFRP-1 و RFRP-3) بالاترین تمایل را برای اتصال به گیرنده‌های NPDF نوع ۱ مستقر در نواحی مزبور در مغز از خود نشان می‌دهند و هر دو این پپتیدها عمدتاً بواسطه اتصال به این گیرنده اثرات خود را بر تنظیم اخذ غذا در مهره داران، اعمال می‌کنند [۱۱]. بنابراین به نظر می‌رسد تزریق آنتاگونیست گیرنده NPDF در جوجه‌های گوشتی در مطالعه حاضر، با اثر بر هسته‌های موجود در ناحیه هیپوتالاموسی و بواسطه مسدود کردن این گیرنده‌ها سبب افزایش اخذ غذا تا ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق داخل بطنی مغزی شده است. البته لازم به ذکر است که گزارشات متناقضی در ارتباط با اثرات RFRP-1 و RFRP-3 بر اخذ غذا در گونه‌های مختلف وجود دارد. بعنوان مثال در مطالعه‌ای تزریق RFRP-3 انسانی سبب تحریک اخذ غذا در موش نر شد [۱۲] این در حالیست که بر اساس پژوهشی دیگر تزریق داخل مغزی، RFRP-1 و RFRP-3 موجب تحریک

<sup>15</sup> Median eminence

<sup>16</sup> Paleostriatum Augmentatum

<sup>17</sup> Septal area

<sup>18</sup> Preoptic area

<sup>19</sup> Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH)

<sup>20</sup> Amino acid sequence of human RFRP-3 is: VPNLPQRF-NH<sub>2</sub>

<sup>21</sup> Cline

می‌باشد، در ارتباط هستند [۱۸، ۱۷] و از طرفی پیش تر نیز اثر تنظیمی MC3R و MC4R ملانوکورتینی بر اخذ غذا در پستانداران [۱۸] و پرندگان [۱۹] به اثبات رسیده است. همچنین با توجه به بررسی‌های انجام شده در زمینه شناخت مکانیسم‌های مرتبط با اثرات بی‌اشتهایی کوتاه مدت القایی توسط پپتیدهای خانواده آر اف امیده، به نظر می‌رسد که احتمال میانجی‌گری پپتیدهایی مانند هورمون محرک ملانوسیت [۲۰] یا پپتید شبه گلوکاگون-۱ [۱۱] بسیار قوی‌تر از مکانیسم‌های مرتبط با محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-آدرنال<sup>۲۴</sup> و اثر آن‌ها بر اخذ غذا می‌باشد [۴] که می‌تواند مؤید یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر باشد.

بنابراین به نظر می‌رسد گیرنده NPF1 در اخذ غذای القایی توسط MC4R دارای نقش میانجی‌گری می‌باشد و ارتباط بین نورون‌های مرتبط با RFRP-3 و POMC [۱۷] نیز تأییدی بر وجود تداخل عملکردی بین این دو دسته نورونی گزارش شده در مطالعه حاضر می‌باشد. همچنین بر اساس مطالعات گذشته، اثر هم‌افزایی سیستم ملانوکورتینی بر اثرات هیپوفازیک ناشی از آنتاگونیست گیرنده‌های NPF1 (RF9) بر اخذ غذا که در مطالعه حاضر نشان داده شده است منطقی به نظر می‌رسد. هرچند شناخت مکانیسم دقیق این هم‌افزایی نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که در تنظیم مرکزی اخذ غذا در جوجه‌های گوشتی نوزاد بین RFRP-3 و سیستم ملانوکورتین تداخل عملکردی وجود دارد و احتمالاً اثرات هیپوفازیک ناشی از MC4R در اخذ غذا در جوجه‌های نوزاد گوشتی از طریق گیرنده‌های NPF1 میانجی‌گری می‌شود.

## تشکر و قدردانی

از همکاری گروه فیزیولوژی و کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، همکاران ارجمند آزمایشگاه مرکزی دامپزشکی (آزمایشگاه دکتر رستگار) و همچنین معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که حمایت‌های

سبب بروز بی‌اشتهایی در جوجه‌ها شد اما این اثر در مورد NPF1 سبب بروز بی‌اشتهایی طولانی‌مدت شد. در ارتباط با علت مشاهدات متفاوت در مطالعات دیگر اینگونه آمده است که اثرات بی‌اشتهایی ناشی از تزریق NPF1 و RFRP-3 از طریق دو زیرگروه مختلف گیرنده‌های NPF1 در ناحیه هیپوتالاموس میانجی‌گری می‌شود به این معنی که بی‌اشتهایی ناشی از RFRP-3 از طریق گیرنده‌های NPF1 و بی‌اشتهایی القایی توسط NPF1 از طریق گیرنده‌های NPF1 نوع ۲ تنظیم شده است و بی‌اشتهایی طولانی مدت القایی توسط NPF1 احتمالاً به علت تمایل شدید این پپتید به این گیرنده نسبت به NPF1 نوع ۱ باشد [۱۵] این در حالی است که اثرات هیپوفازیک ناشی از RFRP-3 تنها از طریق گیرنده‌های NPF1 نوع ۱ میانجی‌گری می‌شود.

بعلاوه مطابق یافته‌های ما متعاقب تزریق همزمان PG-931 و RF9، اثرات هیپوفازیک ناشی از PG-931 در جوجه‌های نوزاد گوشتی به‌طور معنی‌داری تضعیف شده و کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد اثرات بی‌اشتهایی ناشی از تحریک MC4R در جوجه‌های نوزاد از طریق گیرنده‌های NPF1 میانجی‌گری می‌شود. اگرچه این نتیجه در راستای مشاهدات حاصل از مطالعات کلاین و همکارانش می‌باشد اما براساس اطلاعات نویسندگان، قبلاً هیچ گزارشی مبنی بر وجود تداخل عملکردی بین گیرنده NPF1 و سیستم ملانوکورتینی بر اخذ غذا در جوجه‌ها گزارش نشده است تا بتوان نتایج آن را با مطالعه حاضر مقایسه کرد. اما در جهت تقویت یافته‌های مطالعه حال حاضر، ارتباطی بین RFRP-3 و سیستم ملانوکورتینی در ناحیه پستی-میانی هیپوتالاموس گزارش شده است به نحوی که بیان پپتید RFRP-3 در روزهای کوتاه زمستانی بواسطه ترشح ملاتونین کاهش یافته و به نظر می‌رسد که RFRP-3 سیگنال‌های ملاتونین خروجی به سمت نورون‌های کیس<sup>۲۲</sup> مستقر در ناحیه هسته کمانی را تقویت می‌کند [۱۶].

بعلاوه در مطالعه دیگری نشان داده شده است که نورورن‌های RFRP-3 با دستجات نورورنی POMC و پپتید مرتبط با آگوتی<sup>۲۳</sup> مستقر در هسته کمانی هیپوتالاموس که از هسته‌های اصلی مرتبط با اخذ غذا در پستانداران و پرندگان

<sup>24</sup> Melanocyte-stimulating hormones

<sup>25</sup> Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

<sup>26</sup> The hypothalamic-pituitary-adrenal axis

<sup>22</sup> Kiss-1 neurons

<sup>23</sup> Agouti-related peptide



مالی انجام طرح را عهده‌دار شد، تشکر و قدردانی می‌شود.

## نقش نویسندگان

ی.م: انجام آزمایش و نوشتن مقاله; م.ز: ایده پرداز و آنالیز داده ها; م.خ: ایده پرداز و نوشتن مقاله.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## فهرست منابع

- [1] Sharkey KA, Darmani NA, Parker LA, Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system. *Eur J Pharmacol* 722 (2014) 134-146.
- [2] Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H, Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 22 (2010)716-727.
- [3] Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ, Projections of RFamide-related Peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 690-697.
- [4] Cline MA, Bowden CN, Calchary WA, Layne JE, Short-term anorexigenic effects of central neuropeptide VF are associated with hypothalamic changes in chicks. *J Neuroendocrinol* 20 (2008) 971-977.
- [5] Strader AD, Schiöth HB, Buntin JD, The role of the melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (*Streptopelia risoria*) feeding behavior. *Brain Res* 960 (2003) 112-121.
- [6] Ahmadi F, Zendehtel M, Babapour V, Panahi N, CRF1/CRF2 and MC3/MC4 receptors affect glutamate-induced food intake in neonatal meat-type chicken. *Br J Poult Sci* 21(2019) 1-10.
- [7] Fu LY, van den Pol AN, Kisspeptin directly excite anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 30 (2010) 10205-10219.
- [8] Qi W, Ding D, Salvi RJ, Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hear Res* 236 (2008) 52-60.
- [9] Furuse M, Matsumoto M, Saito N, Sugahara K, Hasegawa S, The central corticotropin-releasing factor and glucagon-like peptide -1 in food intake of the neonatal chick. *Eur J Pharmacol* 339 (1997) 211-214.
- [10] Saito ES, Kaiya H, Tachibana T, Denbow DM, Kangawa K, Furuse M, Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin-releasing factor system in neonatal chicks. *Regul Pept* 125 (2005) 201-208.
- [11] Tachibana T, Sato M, Oikawa D, Takahashi H, Boswell T, Furuse M, The anorexic effect of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin releasing factor in chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147 (2007) 173-178.
- [12] Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K, Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 199 (2008) 105-112.
- [13] Newmyer BA, Cline MA, Neuropeptide SF is associated with reduced food intake in chicks. *Behav Brain Res* 205 (2009) 311-314.
- [14] Zendehtel M, Hassanpour S, Central regulation of feed intake in mammals and birds: a review. *Neurotransmitter* 1(2014) 1-7.
- [15] Liu Q, Guan XM, Martin WJ, McDonald TP, Clements MK, Jiang Q, Zeng Z, Jacobson M, Williams DL Jr, Yu H, Bomford D, Figueroa D, Mallee J, Wang R, Evans J, Gould R, Austin CP, Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J Biol Chem* 276 (2001) 36961-36969.
- [16] Ancel C, Bentsen AH, Sebert ME, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V, Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinol* 153 (2012) 1352-1363.
- [17] Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ, Projections of RFamide-related Peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21(2009) 690-697.
- [18] Lu XY, Barsh GS, Akil H, Watson SJ, Interaction between  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23 (2003) 7863-7872.
- [19] Hassanpour S, Zendehtel M, Babapour V, Charkhkar S, Endocannabinoid and nitric oxide interaction mediates food intake in neonatal chicken. *Br Poult Sci* 56 (2015) 443-451.
- [20] Anand BK, Brobeck JR, Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24 (1951) 123-146.

## Research paper

**Modulatory role of neuropeptide FF receptor on hypophagy through melanocortin system in neonatal meat-type chickens**

Yasaman Moosadoost, Morteza Zendehtdel\*, Mina Khodadadi

*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

Received: 6 June 2020

Accepted: 23 May 2020

**Abstract**

**Background and aims:** RFamide-related Peptide-3 (RFRP-3) belongs to the RFamide family which plays a key role in appetite regulation by stimulation of NPF receptor in vertebrates. The present study aimed to investigate the effects of NPF receptor on feeding behavior and its interaction with melanocortin systems in neonatal chickens.

**Methods:** Two hundred and Twenty neonatal male broiler-type (*ROSS 308*) chickens were divided randomly into 5 experimental groups. Each experiment had a control group and three treatment groups ( $n=11$ ). Cumulative food intake was recorded and analyzed in five-day-old chicks, after intracerebroventricular injection at 30, 60 and 120 minutes after injection.

**Results:** Injection of MC3R receptor agonist ( $\gamma 1$ -MSH; 5, 10 pmol) and MC4R receptor agonist (PG-931; 25, 50 pmol) decreased food intake ( $p < 0.05$ ). However, injection of 8 and 16 nmol of NPF receptor antagonist (RF9) increased food intake in neonatal chicks in all time-points ( $p < 0.05$ ). Co-injection of RF9 and  $\gamma 1$ -MSH showed no significant alteration on hypophagic effect induced by  $\gamma 1$ -MSH ( $p \geq 0.05$ ). Yet, co-injection of RF9 and PG-931 attenuated the hypophagic effect of PG-931 in all time-points ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of the present study indicate that the hypophagic effect of MC4R in neonatal male broiler-type (*ROSS 308*) chickens may be mediated by NPF receptor.

**Keywords:** Food intake, Chicken, Intracerebroventricular injection, Melanocortin, Neuropeptide FF

**Please cite this article as follows:**

Moosadoost Y, Zendehtdel M, Khodadadi M, Modulatory role of neuropeptide FF receptor on hypophagy through melanocortin system in neonatal meat-type chickens. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 214-223.

\*Corresponding author: zendehtdel@ut.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-8252-9423)