

مقاله پژوهشی

نقش مسیر کیس پپتین /GPR54 در میانجیگری اثرات مرفین بر بیان ژن نوروپپتید Y در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر

همایون خزعلی^{۱*}، فریا محمودی^۲، مهیار جان احمدی^۳

۱. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۳۱ شهریور ۹۴

دریافت: ۱۶ شهریور ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: مسیرهای عصبی داخل هیپوتالاموس نوروپپتید Y (NPY)، اپیوئیدها و کیس پپتین از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های فعالیت تولیدمثلی هستند. مرفین بیان ژن NPY و کیس پپتین (Kiss1) را کاهش می‌دهد. در حالی که کیس پپتین یا نالوکسون اثرات تحرکی بر بیان ژن NPY اعمال می‌کنند. در این تحقیق نقش مسیر کیس پپتین /GPR54 در میانجیگری اثرات مرفین بر بیان ژن NPY در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بررسی شد.

روش‌ها: چهل و پنج موش صحرایی نر ویستار به وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم در ۹ گروه پنج‌تایی سالی، مرفین (۵ mg/kg)، نالوکسون (۲ mg/kg)، کیس پپتین (۱ nM)، پپتید ۲۳۴ (۱ nM)، نالوکسون/مرفین، کیس پپتین/مرفین، نالوکسون/کیس پپتین، و مرفین/پپتید ۲۳۴ دریافت کردند. نالوکسون و مرفین به صورت زیرپوستی و کیس پپتین و پپتید ۲۳۴ از طریق بطن سوم مغزی تزریق گردید. هیپوتالاموس نمونه‌ها جمع‌آوری شد. بیان نسبی ژن NPY با روش sqRT-PCR تعیین شد.

یافته‌ها: مرفین سبب کاهش معنی‌دار و کیس پپتین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن NPY در مقایسه با سالی، تزریق همزمان کیس پپتین/مرفین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن NPY در مقایسه با مرفین و کاهش معنی‌دار بیان ژن این ژن در مقایسه با کیس پپتین گردید. تزریق همزمان نالوکسون/کیس پپتین بیان ژن NPY را در مقایسه با سالی، نالوکسون یا کیس پپتین افزایش داد که این افزایش در مقایسه با سالی و نالوکسون از نظر آماری معنی‌دار بود. تزریق همزمان مرفین/پپتید ۲۳۴ بیان ژن NPY را در مقایسه با گروه سالی و مرفین کاهش داد که این کاهش در مقایسه با سالی از نظر آماری معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: علاوه بر کاهش فعالیت مسیر کیس پپتین /GPR54، احتمال دارد مسیرهای عصبی دیگری نیز در میانجیگری اثرات مهار مرفین بر فعالیت نورون‌های NPY نیز دخالت داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: ژن NPY، کیس پپتین، مرفین، نالوکسون

مقدمه

بر روی سطوح بیان نوروپپتیدهای هیپوتالاموس یک هدف بالقوه برای درمان اختلالات متابولیکی و تولیدمثل محسوب می‌شود. نوروپپتید Y (NPY) پپتید هیپوتالاموس با ۳۶ اسیدآمینو است که علاوه بر افزایش برداشت غذا یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در کنترل فرایند تولیدمثل است. NPY تحریک‌کننده نورون‌های GnRH محسوب شده و اعمال تولید مثلی را در سطح هیپوتالاموس از طریق کنترل ترشح GnRH

هیپوتالاموس جایگاه اصلی برای تنظیم متابولیسم و فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادها (HPG) است و مطالعه

* نویسنده مسئول مکاتبات: homayoun_khazali@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

تنظیم می‌کند. مطالعات پیشین نشان داده است که تزریق NPY سبب تحریک آزادسازی GnRH/LH و به دنبال آن آزادسازی هورمون‌های استروئیدی گنادها می‌شود [۱، ۲]. در حالی که تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده NPY سبب مهار آزادسازی GnRH/LH می‌گردند [۳].

کیس پپتین نوروپپتید ۵۴ اسیدآمینه‌ای است که به عنوان لیگاند آندوژن برای گیرنده GPR54 عمل می‌کند [۴، ۵]. مطالعات در گونه‌های مختلف نشان داده است که ایجاد جهش در ژن گیرنده GPR54 سبب ایجاد هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک و اختلال در تکامل محور HPG در طی بلوغ می‌گردد [۴، ۵]. در جوندگان نورون‌های کیس پپتین به میزان بالایی در هسته قوسی و به میزان کمی در هسته پری و نتریکولار شکمی قدامی (AVPV) هیپوتالاموس متمرکز شده‌اند [۴، ۵]. در جوندگان، نشخوارکنندگان و پریمات‌ها کیس پپتین با اتصال به گیرنده خود (GPR54 or Kiss1r) واقع بر روی نورون‌های GnRH، آزادسازی GnRH/LH را تحریک می‌کند [۴، ۵] و تزریق آنتاگونیست گیرنده GPR54 به نام پپتید ۲۳۴ (P234) اثرات تحریکی کیس پپتین بر آزادسازی GnRH/LH را مهار می‌کند [۵]. مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌های کیس پپتین در رله کردن اطلاعات هورمون‌های استروئیدی [۶] و اطلاعات متابولیکی [۷، ۸] به محور تولید مثلی نقش دارند.

پپتیدهای اپیوئیدی درون‌زاد در دستگاه عصبی مرکزی از مهم‌ترین پپتیدهای مهاری مدار عصبی هیپوتالاموسی کنترل‌کننده آزادسازی GnRH/LH و عامل ایجاد هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک محسوب می‌شوند. پپتیدهای اپیوئیدی نظیر β -اندورفین و مورفین از طریق گیرنده میو (μ) اپیوئیدی موجب مهار آزادسازی GnRH/LH، تستوسترون یا استرادیول پلازما، اختلالات سیکل قاعدگی، ناباروری و سایر اختلالات فعالیت محور HPG می‌شوند [۹-۱۱]. در حالی که با تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده μ اپیوئیدها نظیر نالوکسون یا نالتراکسون اثرات حاصل خنثی شده و با تزریق نالوکسون ترشح LH و فراوانی پالس‌های LH در انسان و گونه‌های مختلف جانوری افزایش می‌یابد. همچنین نشان داده شده است که تزریق نالوکسون باعث تسریع بلوغ جنسی می‌گردد [۹-۱۱]. با وجود غالب بودن اثرات مرکزی اپیوئیدها در سرکوب فعالیت محور تولیدمثلی در انسان و سایر گونه‌های

جانوری، گزارش بسیار اندکی درباره اثرات مستقیم پپتیدهای اپیوئیدی بر آزادسازی GnRH وجود دارد و اکثر مطالعات نشان داده‌اند که پپتیدهای اپیوئیدی اثرات مهاری خود بر آزادسازی GnRH/LH را به طور غیر مستقیم و از طریق تاثیر بر میزان فعالیت نورون‌های رابط دستگاه عصبی مرکزی نظیر نورون‌های GABA ارژیکی، نورون‌های نورآدرنژیکی، NPY ارژیکی یا کیس پپتین‌ژیکی یا اعمال می‌کنند [۱۲-۱۴]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که مورفین سطوح NPY را در هیپوتالاموس به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. بلوکه کردن اثرات اپیوئیدها با تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی نظیر نالوکسان تجمع NPY را در ناحیه برجستگی میانی همگام با افزایش ترشح LH افزایش می‌دهد [۲۰-۱۶]. همچنین نشان داده شده است که تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده NPY اثرات مهاری اپیوئیدها بر فعالیت محور HPG را فعال می‌سازد. همچنین مطالعات پیشین نشان داده‌اند که آکسون‌های نورون‌های NPY در ارتباط نزدیک با نورون‌های کیس پپتین است و میزان بیان کیس پپتین در موش‌های حاوی جهش در ژن NPY بسیار پایین است و mRNA گیرنده کیس پپتین (GPR54 یا Kiss1r) بر روی نورون‌های NPY در موش‌ها بیان می‌شود [۲۰-۱۶]. از طرفی نشان داده شده است که مورفین میزان بیان ژن کیس پپتین را در هیپوتالاموس کاهش می‌دهد [۱۴]. با توجه به اهمیت مسیرهای پیام‌رسانی میانجیگری شده توسط کیس پپتین، اپیوئیدها و NPY در کنترل فعالیت محور تولیدمثلی در این تحقیق برای اولین بار نقش مسیر کیس پپتین/GPR54 در میانجیگری اثرات مورفین بر بیان ژن NPY در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی) به وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم برای آزمایش انتخاب شدند که در شرایط استاندارد (دمای $20 \pm 2^\circ\text{C}$ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) نگهداری می‌شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. آزمایشات با تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و با توجه به راهنمای استفاده و

نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتشر شده توسط انستیتوی ملی سلامت ایالات متحده آمریکا (NIH Publications No. 80-23 revised 1996). انجام گرفت و از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد.

عمل جراحی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (80 mg/kg BW) و زایلازین (10 mg/kg BW) انجام شد. کانول ساخته شده از سرسنگ تزریقی gauge ۲۲ با استفاده از دستگاه استرئوتاکس و با کمک سه عدد پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی در سطح جمجمه تثبیت شد. بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس، نوک کانول در مختصات بطن سوم ($AP = -2.3$, $ML = 0.0$, $DV = 6.5$) قرار گرفت. مختصات DV از سطح جمجمه در نظر گرفته شد [۱۶]. حیوانات بعد از جراحی به قفسهای انفرادی برگردانده شدند و به آنها یک هفته اجازه بهبودی داده شد. بعد از یک هفته دوره بهبودی ۴۵ موش صحرایی در ۹ گروه (در هر گروه $n = 5$) سالیین (ICV, 3 μ l, 3) + سالیین (sc, 200 μ l, 200)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3) + مرفین (sc, 200 μ l, 5 mg/kg)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3) + نالوکسون (sc, 200 μ l, 2 mg/kg)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3) + مرفین (sc, 200 μ l, 5 mg/kg) + نالوکسون (sc, 200 μ l, 1 mg/kg)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3) + کیس پپتین (ICV, 3 μ l, 3 nM) + سالیین (sc, 200 μ l, 200)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3 nM) + کیس پپتین (sc, 200 μ l, 200)، سالیین (ICV, 3 μ l, 3 nM) + مرفین (sc, 200 μ l, 200)، کیس پپتین (ICV, 3 μ l, 3 nM) + نالوکسون (sc, 200 μ l, 5 mg/kg)، یا پپتید ۲۳۴ (ICV, 3 μ l, 3 nM) + مرفین (sc, 200 μ l, 5 mg/kg) را در ساعت ۹:۳۰-۹:۰۰ دریافت کردند. تزریق کیس پپتین (AnaSpec Co. USA) و پپتید ۲۳۴ (Phoenix Pharmaceutical Co, USA) با استفاده از سر سرنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ μ l وصل شده بود صورت گرفت در حالی که مرفین سولفات (شرکت تماد، ایران) و نالوکسون هیدروکلراید (شرکت تولید دارو، ایران) به صورت زیر پوستی تزریق گردید.

چهار ساعت بعد از تزریق و بیهوشی سر حیوان جدا شد. جمجمه آن شکافته شد و مغز بلافاصله خارج گردید. سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گرفته و برشی به ضخامت mm ۴ حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کراسما، از

پشت تا مجاورت دستگاه پستانی-تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه گردید. هیپوتالاموس جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شد و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری گردید.

نمونه‌های هیپوتالاموسی با استفاده از pureZol و دستگاه هوموژنایزر هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم، اپروپروپانول و اتانول ۷۵٪ طبق دستورالعمل کیت PureZol (Bio Rad, U.S.A.) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (تهیه شده از شرکت سیناژن) حل شد و تا زمان سنتز cDNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. غلظت RNA با خواندن میزان جذب RNA در nm ۲۶۰ تعیین شد.

cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ μ g از RNA مطلق، پرایمر پلی تیمین، آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (vivantis, Malaysia) بر طبق دستورالعمل کیت توسط دستگاه ترمال سایکلر Bio RAD, U.S.A. سنتز شد. از آنجا که گلیسر آلدئید ۳ فسفو دهیدروژناز (GAPDH) به طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله مغز سنتز می‌شود. تعیین سطح mRNA آن توسط روش RT-PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNA نوروپپتید Y استفاده شد. برای انجام PCR نمونه‌های cDNA برای ۳۳ چرخه (95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 58°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه) در حجم نهایی ۵۰ μ l (cDNA template (2 μ l), $10\times$ PCR buffer (5 μ l), 50 mM MgCl_2 (1.5 μ l), 10mM dNTP Mix (1 μ l), 100 μ M of sense and antisense primers (1 μ l of each one) and 1.25 U Taq DNA Polymerase (0.25 μ l), sterile water (38.25 μ l)) بر حسب دستورالعمل کیت PCR (Bio RAD, U.S.A.) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A.) مورد PCR قرار گرفتند. توالی‌های الیگونوکلوئیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس GAPDH و NPY در جدول ۱ آمده است [۱۴]. محصولات GAPDH و NPY حاصل از PCR به ترتیب ۱۱۲ و ۳۵۱ جفت بازی هستند. محصولات PCR حاصل از GAPDH و NPY به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ و ۱٪ آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ‌آمیزی safe red (شرکت زیست فناوری کوثر، ایران) نمایان شده و توسط نرم افزار Image J کمی شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای GAPDH و NPY

پرایمر	توالی در جهت ۵' به ۳' (از چپ به راست)
سنس GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC
آنتی‌سنس GAPDH	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG
سنس NPY	TAGGTAACAAACGAATGGGG
آنتی‌سنس NPY	AGGATGAGATGAGATGTGGG

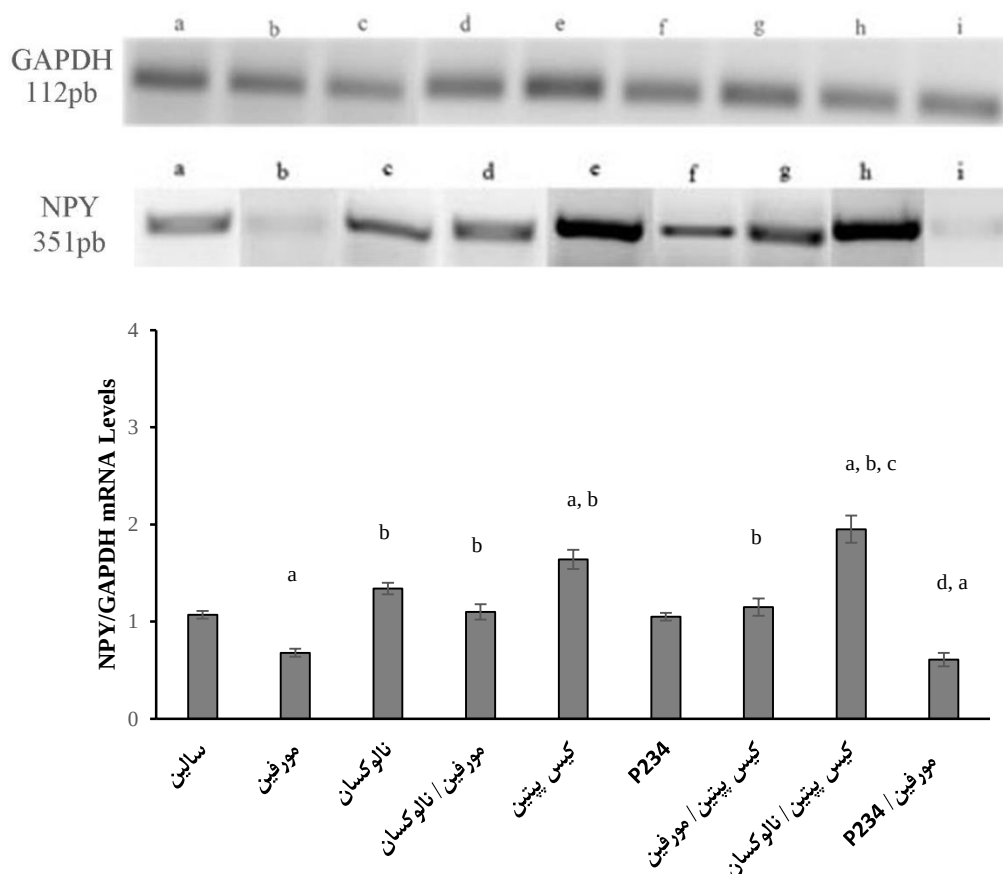
نتایج حاصل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین رانه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و نرم افزار SPSS (version 16) آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون متعاقب توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده نتایج با $p < 0.05$ معنی دار گزارش شدند.

یافته‌ها

مرفین در مقایسه با گروه سالیین بیان نسبی ژن NPY را به میزان $0.36 \pm$ برابر کاهش داد که این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$ ، شکل ۱). نالوکسون یا تزریق همزمان نالوکسون و مرفین میانگین بیان نسبی ژن NPY را در مقایسه با گروه سالیین به ترتیب به میزان $0.25 \pm$ یا $0.02 \pm$ برابر افزایش داد که این میزان افزایش در هیچ یک از گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. تزریق نالوکسون یا تزریق همزمان نالوکسون و مرفین بیان نسبی ژن NPY را در مقایسه با گروه مرفین به ترتیب به میزان $0.97 \pm$ یا $0.62 \pm$ برابر افزایش داد که این میزان افزایش در هر دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$ ، شکل ۱). کیس‌پپتین در مقایسه با گروه سالیین بیان نسبی ژن NPY را به میزان $0.53 \pm$ برابر افزایش داد که این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$ ، شکل ۱). پپتید ۲۳۴ بیان نسبی ژن NPY را در مقایسه با گروه سالیین به میزان $0.02 \pm$ برابر کاهش داد که این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. تزریق همزمان کیس‌پپتین/مورفین یا تزریق همزمان کیس‌پپتین/نالوکسان بیان نسبی ژن NPY را در مقایسه با گروه سالیین به ترتیب به میزان $0.07 \pm$ یا $0.82 \pm$ برابر افزایش داد که این میزان افزایش در گروه تزریق همزمان کیس‌پپتین/نالوکسان در مقایسه با گروه سالیین از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$ ، شکل ۱). تزریق همزمان کیس‌پپتین/مورفین بیان نسبی ژن NPY را در مقایسه با گروه مرفین به میزان $0.69 \pm$ برابر افزایش و در مقایسه با گروه

بحث

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که تزریق مرفین یا کیس‌پپتین به ترتیب سبب کاهش معنی‌دار و افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن NPY در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالیین گردید. مقادیر تزریقی مرفین و کیس‌پپتین استفاده شده در این تحقیق بر اساس مطالعات پیشین انتخاب گردیده است که اثرات مهاری یا تحریکی آنها بر فعالیت محور تولیدمثلی یا سنتز NPY را نشان داده بودند [۷، ۱۰، ۱۱، ۱۷، ۱۸]. نتایج حاصل از این تحقیق منطبق بر یافته‌های پیشین است که اثرات اپیوئیدها، آنتاگونیست اپیوئیدها یا کیس‌پپتین را بر میزان بیان mRNA NPY مورد بررسی قرار دادند. اثرات تحریکی NPY بر فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادها به طور عمده از طریق گیرنده نوع Y1 NPY میانجی‌گری می‌شود و تزریق آنتی‌بادی‌های علیه NPY یا آنتاگونیست‌های گیرنده Y1 به داخل هسته قوسی اثرات تحریکی NPY بر آزادسازی GnRH/LH را بلوکه می‌کند [۲۰-۱۶]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پایانه نورون‌های NPY بر روی نورون‌های β -اندورفین در هسته قوسی قرار گرفته است. از طرفی مرفین سطوح NPY را در هیپوتالاموس به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. بلوکه کردن اثرات اپیوئیدها با تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی نظیر نالوکسون تجمع NPY را در ناحیه برجستگی میانی همگام با افزایش ترشح LH



شکل ۱- اثرات تزریق ۵mg/kg مورفین، ۲ mg/kg نالوکسون، ۱nM کیس‌پپتین، ۱nM پپتید ۲۳۴ بر بیان نسبی ژن NPY در موش‌های صحرایی نر. داده‌ها نسبت به ژن خانه‌دار گلیسرآلدئید ۳-فسفو دهیدروژناز (GAPDH) نرمال شده است. در ستون‌ها داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین ارائه شده است. در هر گروه $n = 5$ است و از نظر آماری $p < 0.05$ معنی‌دار گزارش شده است. در باندها: a: سالین، b: مورفین، c: نالوکسون، d: مورفین و نالوکسون، e: کیس‌پپتین، f: پپتید ۲۳۴، g: کیس‌پپتین و مورفین، h: کیس‌پپتین و نالوکسون، i: مورفین و پپتید ۲۳۴ می‌باشند. a: تفاوت معنی‌دار با سالین، b: تفاوت معنی‌دار با مورفین، c: تفاوت معنی‌دار با نالوکسون، d: تفاوت معنی‌دار با پپتید ۲۳۴.

پیشین نشان داده‌اند که آکسون‌های نورون‌های NPY در ارتباط نزدیک با نورون‌های کیس‌پپتین است و میزان بیان کیس‌پپتین در موش‌های حاوی جهش در ژن *NPY* بسیار پایین است [۲۰] و mRNA گیرنده کیس‌پپتین (*GPR54* یا *Kiss1r*) بر روی نورون‌های NPY در موش‌ها بیان می‌شود. نشان داده شده است که تزریق کیس‌پپتین علاوه بر نورن‌های GnRH میزان تخلیه نورون‌های دیگر را نیز افزایش می‌دهد [۲۰] و به همین دلیل آنها پیشنهاد کرده‌اند که علاوه بر تاثیر مستقیم، نورون‌های کیس‌پپتین ممکن است اثرات غیر مستقیم بر ترشح GnRH/LH داشته باشند. بنابراین نورون‌های NPY یکی از مسیرهای کاندید در میانجیگری اثرات غیر مستقیم کیس‌پپتین بر کنترل آزادسازی GnRH باشد. نورون‌های NPY از هسته قوسی هیپوتالاموس به طور

افزایش می‌دهد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که تزریق نالوکسون اثرات مهاری اپیوئیدها بر سنتز NPY و آزادسازی هورمون LH را بلوکه می‌کند و غلظت NPY را در نواحی مختلف هیپوتالاموس دخیل در کنترل فعالیت محور تولیدمثلی از جمله هسته قوسی، ناحیه پری‌اپتیک میانی (mPOA) و ناحیه برجستگی میانی افزایش می‌دهد [۱۶-۲۰]. نشان داده شده است که نالوکسون میزان بیان mRNA *NPY* در ناحیه هیپوتالاموس قاعده‌ای میانی را تحریک می‌کند که مسئول کنترل آزادسازی تونیک GnRH/LH در هر دو جنس نر و ماده می‌باشد [۱۶-۲۰] و تزریق داخل بطن مغزی آنتی بادی علیه NPY سبب کاهش قابل ملاحظه LH می‌شود و تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده NPY اثرات مهاری اپیوئیدها بر فعالیت محور HPG را فعال می‌سازد [۱۶-۲۰]. همچنین مطالعات

مقایسه با سالین یا مورفین کاهش داد که این میزان کاهش فقط در مقایسه با سالین از نظر آماری معنی‌دار بود. از آنجا که تاکنون گزارشی درباره نقش میانجیگری کیس‌پپتین در اعمال اثرات مورفین بر بیان ژن NPY در هیچ یک از جنس‌ها و گونه‌های جانوری وجود ندارد بنابراین مقایسه داده‌های حاصل با نتایج تحقیقات پیشین امکان‌پذیر نیست. با این وجود، نتایج حاصل از این تحقیق تا حدودی نشان‌دهنده احتمال وجود برهم‌کنش بین مسیرهای پیام‌رسانی کیس‌پپتین/GPR54 و اپیوئیدها در تنظیم محور نورواندوکرینی تولیدمثل از طریق تنظیم فعالیت نورون‌های NPY می‌باشد. ولی از آنجا که با بلوکه کردن گیرنده کیس‌پپتین با تزریق همزمان پپتید ۲۳۴ مورفین بیان نسبی ژن NPY در مقایسه با تزریق مورفین تنها کاهش معنی‌دار نشان نداد احتمال دارد که در میانجیگری اثرات مورفین بر فعالیت نورون‌های NPY علاوه بر کاهش فعالیت مسیر کیس‌پپتین/GPR54 مسیرهای عصبی دیگر یا حتی اثرات مستقیم مورفین نیز دخیل باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق تا حدودی نشان‌دهنده احتمال وجود برهم‌کنش بین مسیرهای پیام‌رسانی کیس‌پپتین/GPR54 و اپیوئیدها در تنظیم محور نورواندوکرینی تولیدمثل از طریق تنظیم فعالیت نورون‌های NPY می‌باشد ولی احتمال دارد که در میانجیگری اثرات مورفین بر فعالیت نورون‌های NPY علاوه بر کاهش فعالیت مسیر کیس‌پپتین/GPR54 مسیرهای عصبی دیگری نیز دخیل باشند.

ملاحظات مالی

این تحقیق با حمایت مالی و همکاری صندوق حمایت از پژوهشگران (Iranian National Science Foundation) با شماره گرنت ۹۲۰۴۴۲۴۸ به انجام رسیده است. بدین وسیله نویسندگان از حمایت مالی Iranian National Science Foundation تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

مستقیم بر روی نورون‌های GnRH ارسال شده است و گیرنده‌های NPY و نورون‌های GnRH هم مکانی دارند. به علاوه، نشان داده شده است که گیرنده کیس‌پپتین بر روی نورون‌های NPY بیان شده و تزریق کیس‌پپتین سبب افزایش بیان NPY می‌شود [۱۵]. همچنین مطالعات *in vitro* با استفاده از دودمان سلول هیپوتالاموسی ترشح‌کننده NPY گزارش کرده‌اند که کیس‌پپتین بیان mRNA ی NPY را تحریک می‌کند و آن ممکن است به طور مستقیم در سنتز NPY نقش ایفا کند [۲۰].

مطالعات آزمایشگاه ما نشان داده است که تزریق زیر پوستی مورفین سبب کاهش معنی‌دار غلظت پلاسمایی هورمون‌های LH، تستوسترون و بیان نسبی ژن کیس‌پپتین در هیپوتالاموس در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین می‌شود در حالی که بیان نسبی ژن GPR54 در هیپوتالاموس موش‌های نر صحرایی دریافت‌کننده مورفین در مقایسه با گروه سالین تغییری پیدا نمی‌کند [۱۵]. همچنین نشان داده شده است که پایانه نورون‌های NPY به طور مستقیم بر روی نورون‌های GnRH ختم می‌شود و سنتز NPY قبل از آزادسازی GnRH افزایش می‌یابد و NPY به طور مستقیم آزادسازی GnRH را تحریک می‌کند. با وجود این اثرات غیر مستقیم NPY بر فعالیت محور تولیدمثل نیز گزارش شده است. به طوری که تنظیم کاهشی عملکرد اپیوئیدها یا تنظیم افزایشی کیس‌پپتین نقش مهمی در رله کردن اثرات NPY بر فعالیت نورون‌های GnRH اعمال می‌کنند [۱۵]. از طرفی به دلیل عدم بیان گیرنده‌های میو (μ) اپیوئیدی (گیرنده‌های اپیوئیدی دخیل در میانجیگری اثرات فیزیولوژیکی مورفین) در هسته قوسی [۱۵] و اثرات مهارى مورفین بر بیان ژن‌های NPY و Kiss1 در این تحقیق نقش میانجیگری کیس‌پپتین در اعمال اثرات مورفین بر بیان ژن NPY در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بررسی شد تا مشخص گردد که آیا کاهش فعالیت مسیر پیام‌رسانی کیس‌پپتین ممکن است یکی از مسیرهای احتمالی مورفین در کاهش بیان ژن NPY باشد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق همزمان مورفین و کیس‌پپتین سبب افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن NPY در مقایسه با مورفین شد و تزریق همزمان نالوکسون و کیس‌پپتین سبب افزایش بیان نسبی NPY در مقایسه با تزریق نالوکسون تنها یا کیس‌پپتین تنها شد. از طرفی تزریق همزمان پپتید ۲۳۴ و مورفین میانگین بیان نسبی NPY را در

سهم نویسندگان

ه.خ: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش

مقاله؛ ف.م: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ج: مشاوره.

فهرست منابع

- [1] Rodriguez-Sierra JF, Jacobowitz DM, Blake CA, Effects of neuropeptide Y on LH, FSH and TSH release in male rats. *Peptides* 8 (1987) 539-542.
- [2] Dhillon SS, Gingerich S, Belsham DD, Neuropeptide Y induces gonadotropin-releasing hormone gene expression directly and through conditioned medium from mHypoE-38 NPY neurons. *Regul Pept* 156 (2009) 96-103.
- [3] Karla PS, Bonavera JJ, Karla SP, Central administration of antisense oligodeoxynucleotid of neuropeptide Y (NPY) mRNA levels the critical role of newly synthesized in regulation of LHRH release. *Regul Pept* 59 (1995) 215-220.
- [4] d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH, Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional KiSS1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 10714-10719.
- [5] Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP, Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29 (2009) 3920-3929.
- [6] Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M, Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148 (2007) 1774-1783.
- [7] Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K, Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett* 28 (2009) 143-147.
- [8] Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA, KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18 (2006) 298-303.
- [9] Fayez M, Ahmed HH, el Nabarawy F, Shokery IM, el-Bauomy AM, Effects of butorphanol on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels in ovariectomized rats--comparative study with morphine sulphate. *Arch Exp Veterinarmed* 45 (1991) 101-103.
- [10] Ceccarelli I, De Padova AM, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi AM, Single opioid administration modifies gonadal steroids in both the CNS and plasma of male rats. *Neuroscience* 140 (2006) 929-937.
- [11] He D, Mitsushima D, Uemura T, Hirahara F, Funabashi T, Shinohara K, Kimura F, Effects of naloxone on the serum luteinizing hormone level and the number of Fos-positive gonadotropin-releasing hormone neurons in immature female rats. *Brain Res* 85 (2000) 129-135.
- [12] Gurjinder K, Gurcharan K, Role of cholinergic and GABAergic neurotransmission in the opioids-mediated GnRH release mechanism of EBP-primed OVX rats. *Mol Cell Biochem* 219 (2001) 13-19.
- [13] Pages N, Orosco M, Fournier G, Rouch C, Hafi A, Gouch A, Comoy E, Bohuon C, The effects of chronic administration of morphine on the levels of brain and adrenal catecholamines and neuropeptide Y in rats. *Gen Pharmacol* 22 (1991) 943-947.
- [14] Mahmoudi F, Khazali H, Janahmadi M. *Molecular interactions of kisspeptin/GPR54 signaling system and morphine on LH hormone secretion in wistar rats* [dissertation]. Shahid Beheshti Univ., 2014.
- [15] Li MD, Kane JK, Parker SL, McAllen K, Matta SG, Sharp BM, Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 867 (2000) 157-164.
- [16] Xu B, Sahu A, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP, Disinhibition from opioid influence augments hypothalamic neuropeptide Y (NPY) gene expression and pituitary luteinizing hormone release: effects of NPY messenger ribonucleic acid antisense oligodeoxynucleotides. *Endocrinology* 137 (1996) 78-84.
- [17] Xu B, Sahu A, Crowley WR, Leranath C, Horvath T, Kalra SP, Role of neuropeptide-Y in episodic luteinizing hormone release in ovariectomized rats: an excitatory component and opioid involvement. *Endocrinology* 133 (1993) 747-754.
- [18] Sahu A, Crowley WR, Kalra SP, An opioid-neuropeptide-Y transmission line to luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons: a role in the induction of LH surge. *Endocrinology* 126 (1990) 876-883.
- [19] Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C, Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology* 131 (1992) 2461-2467.
- [20] Kim GL, Dhillon SS, Belsham DD, Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamic neurons. *Endocrinology* 151 (2010) 5038-5047.

Research paper

Role of kisspeptin/GPR54 pathway in mediating morphine's effects on hypothalamic NPY gene expression in male rats

Homayoun Khazali^{*1}, Fariba Mahmoudi², Mahyar Janhahmadi³

1. Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Neurophysiology Research Center and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 7 September 2015

Accepted: 22 September 2015

Abstract

Background and aim: Intra-hypothalamic neural pathways including neuropeptide Y (NPY), opioids and kisspeptin are among the most important regulators of reproductive function. Morphine decreases *NPY* and kisspeptin (*Kiss1*) gene expression, while kisspeptin or naloxone increases *NPY* gene expressions. In the present study the role of kisspeptin/GPR54 pathway was investigated in mediating morphine's effects on hypothalamic *NPY* gene expression in male rats.

Methods: Forty five male Wistar rats weighing 230-250 g in 9 groups (in each group n = 5) received saline, morphine (5 mg/kg), naloxone (2 mg/kg), kisspeptin (1nM), peptide 234 (1 nM) or co-injection of naloxone/morphine, kisspeptin/morphine, kisspeptin/naloxone, and morphine/peptide234. Naloxone and morphine were injected subcutaneously, while kisspeptin and peptide 234 were injected into third cerebral ventricle. The hypothalamus of the animals was removed and relative *NPY* mRNA levels measured by RT-PCR.

Results: Morphine significantly decreased *NPY* gene expression, while kisspeptin significantly increased the expression. *NPY* gene expression was significantly increased by kisspeptin/morphine compared to saline. However, the expression was significantly decreased by kisspeptin/morphine compared to kisspeptin alone. The injection of kisspeptin/naloxone increased *NPY* gene expression compared to saline, naloxone or kisspeptin alone. This increase was statistically significant compared to saline or naloxone groups. Morphine/peptide234 decreased *NPY* gene expression compared to saline or morphine but the decrease was only statistically significant compared to saline.

Conclusion: It seems that in addition kisspeptin/GPR54 pathway, other intra-hypothalamic neural pathways are also involved in the inhibitory effects of morphine on *NPY* neurons activity.

Keywords: Kisspeptin, Morphine, Naloxone, *NPY* gene

Please cite this article as follows:

Khazali H, Mahmoudi F, Janhahmadi M, Role of kisspeptin/GPR54 pathway in mediating morphine's effects on hypothalamic *NPY* gene expression in male rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2017) 123-130.

*Corresponding author e-mail: homayoun_khazali@yahoo.com

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

E-mail: ijpp@phypha.ir