IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۱ (۲)، ۱۳۰-۱۲۳ تابستان ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

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

همایون خزعلی[۱*]، فریبا محمودی[۲]، مهیار جان‌احمدی[۳]

۱. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. مرکز تحقیقات نورو فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱۶ شهریور ۹۴ پذیرش: ۳۱ شهریور ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: مسیرهای عصبی داخل هیپوتالاموسی نوروپپتید Y(NPY)، اپیوئیدها و کیس‌پپتین از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های فعالیت تولیدمثلی هستند. مرفین بیان ژن *NPY* و کیس‌پپتین (*Kiss1*) را کاهش می‌دهد. در حالی که کیس‌پپتین یا نالوکسون اثرات تحریکی 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 سالین، مرفین (۵ mg/kg)، نالوکسون (۲ mg/kg)، کیس‌پپتین (۱ nM)، پپتید۲۳۴ (۱ nM)، نالوکسون/مرفین، کیس‌پپتین/مرفین، نالوکسون/کیس‌پپتین، و مرفین/پپتید۲۳۴ دریافت کردند. نالوکسون و مرفین به صورت زیرپوستی و کیس‌پپتین و پپتید۲۳۴ 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 کیس‌پپتین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن *NPY* در مقایسه با سالین شد. تزریق همزمان کیس‌پپتین/مرفین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن *NPY* در مقایسه با مرفین و کاهش معنی‌دار بیان این ژن در مقایسه با کیس پپتین گردید. تزریق همزمان نالوکسون/کیس‌پپتین بیان ژن *NPY* را در مقایسه با سالین، نالوکسون یا کیس‌پپتین افزایش داد که این افزایش در مقایسه با سالین و نالوکسون از نظر آماری معنی‌دار بود. تزریق همزمان مرفین/پپتید۲۳۴ بیان ژن *NPY* را در مقایسه با گروه سالین و مرفین کاهش داد که این کاهش در مقایسه با سالین از نظر آماری معنی‌دار بود.

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

واژه‌های کلیدی : ژن *NPY*، کیس‌پپتین، مرفین، نالوکسون

مقدمه

هیپوتالاموس جایگاه اصلی برای تنظیم متابولیسم و فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز-گنادها (HPG) است و مطالعه بر روی سطوح بیان نوروپپتیدهای هیپوتالاموسی یک هدف بالقوه برای درمان اختلالات متابولیکی و تولیدمثل محسوب می‌شود. نوروپپتید Y (NPY) پپتید هیپوتالاموسی با ۳۶ اسیدآمینه 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

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

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

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 کیس‌پپتین به میزان بالایی در هسته قوسی و به میزان کمی در هسته پری ونتریکولار شکمی قدامی (AVPV) هیپوتالاموس متمرکز شده‌اند [۴، ۵]. در جوندگان، نشخوارکنندگان و پریمات‌ها کیس‌پپتین 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 کیس‌پپتین بر آزادسازی GnRH/ LH را مهار می‌کند [۵]. مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌های کیس‌پپتین 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 مهارآزادسازی GnRH/ LH، تستوسترون یا استرادیول پلاسما، اختلالات سیکل قاعدگی، ناباروری و سایر اختلالات فعالیت محور HPG می‌شوند[۱۱-۹]. در حالی که با تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده μ اپیوئیدها نظیر نالوکسون یا نالترکسون 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 [۱۱-۹]. 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 GABAارژیکی، نورون‌های نورآدرنرژیکی،NPY ارژیکی یا کیس‌پپتینرژیکی یا اعمال می‌کنند [۱۴-۱۲]. 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 پیشن 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 و mRNAی گیرنده کیس‌پپتین (*GPR54* یا *Kiss1r*) بر روی نورون های NPY در موش‌ها بیان می‌شود [۲۰-۱۶]. از طرفی نشان داده شده است که مورفین میزان بیان ژن کیس‌پپتین را در هیپوتالاموس کاهش می‌دهد [۱۴]. با توجه به اهمیت مسیرهای پیام‌رسانی میانجیگری شده توسط کیس‌پپتین، اپیوئیدها و NPY در کنترل فعالیت محور تولیدمثلی در این تحقیق برای اولین بار نقش مسیر کیس‌پپتین/GPR54 در میانجیگری اثرات مرفین بر بیان ژن *NPY* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

موش های 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 ۲°C ± ۲۲ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) نگهداری می شدند. 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

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

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 (۸۰ mg/kg BW) و زایلازین (۱۰ mg/kg BW) انجام شد. کانول ساخته شده از سرسرنگ 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 = ۵) سالین (ICV, ۳ µl)+ سالین (sc, ۲۰۰µl)، سالین (ICV, ۳ µl) + مرفین (sc, ۲۰۰µl ، ۵ mg/kg)، سالین (ICV, ۳ µl) + نالوکسون (sc, ۲۰۰µl ، ۲ mg/kg)، سالین (ICV, ۳ µl) + مرفین (sc, ۱۰۰µl، ۵ mg/kg)+ نالوکسون (sc, ۱۰۰µl، ۲ mg/kg)، کیس‌پپتین (ICV, ۳ µl، ۱ nM) + سالین (sc, ۲۰۰ µl)، پپتید ۲۳۴ (ICV, ۳ µl، ۱ nM) + سالین (sc, ۲۰۰ µl)، کیس‌پپتین (ICV, ۳ µl، ۱ nM) + مرفین (sc, ۲۰۰µl، ۵ mg/kg)، کیس‌پپتین (ICV, ۳µl، ۱ nM) + نالوکسون (sc, ۲۰۰µl، ۲ mg/kg) یا پپتید ۲۳۴ (ICV µl, ۳، ۱ nM)+ مرفین (sc, ۲۰۰µl، ۵ mg/kg) را در ساعت ۹:۰۰–۹:۳۰ دریافت کردند. تزریق کیس‌پپتین (AnaSpec Co. USA) و پپتید ۲۳۴ (PhoenixPharmaceutical Co, USA) با استفاده از سر سرنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ µl 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 کیاسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی– تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه گردید. هیپوتالاموس جدا شده بالافاصله 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، ایزوپروپانول 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 ۲۶۰ nm تعیین شد.

cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ µg از RNA مطلق ، پرایمر پلی تیمین، آنزیم DNA پلیمراز 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 mRNAی آن توسط روش RT-PCR نیمه کمی برای نرمال کردن نمونه‌های mRNAی نوروپپتید Y استفاده شد. برای انجام PCR نمونه‌های cDNA برای ۳۳ چرخه (۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه) در حجم نهایی ۵۰ µl (cDNA template (2 µl), 10× PCR buffer (5 µl), 50 mM $MgCl_2$(1.5 µl), 10mM dNTP Mix(1 µl), 100 µM of sense and antisense primers (1 µl of each one) and 1.25 U Taq DNA Polymerase(0.25 µl), sterile water (38.25 µl)) 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 الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس GAPDH و NPY در جدول ۱ آمده است [۱۴، ۱۵]. 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.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

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 ± انحراف معیار از میانگین رائه شدند. داده ها با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و نرم افزار SPSS (version16) آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده ها با آزمون متعاقب توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده نتایج با $p < ۰/۰۵$ معنی دار گزارش شدند.

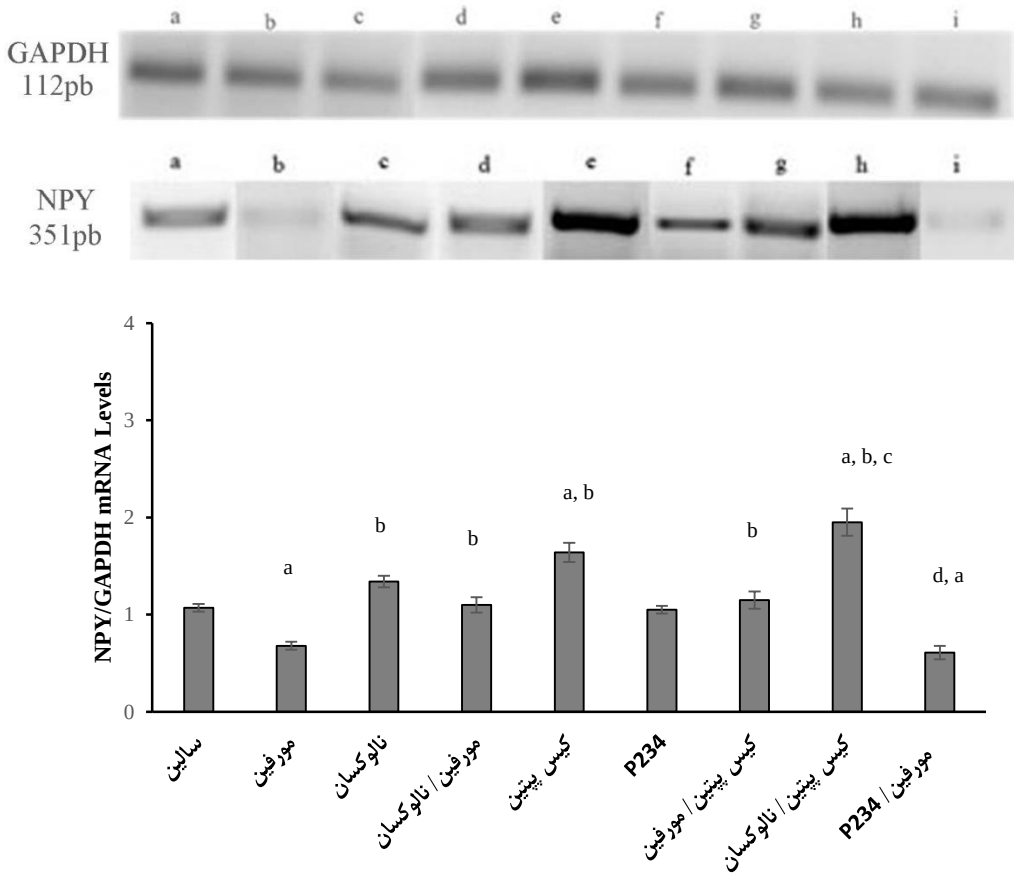
یافته‌ها

مرفین در مقایسه با گروه سالین بیان نسبی ژن *NPY* را به میزان ۰/۳۶ برابر کاهش داد که این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). نالوکسون یا تزریق همزمان نالوکسون و مرفین میانگین بیان نسبی ژن *NPY* را در مقایسه با گروه سالین به ترتیب به میزان ۰/۲۵ یا ۰/۰۲ 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 ۰/۹۷ یا ۰/۶۲ برابر افزایش داد که این میزان افزایش در هر دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). کیس‌پپتین در مقایسه با گروه سالین بیان نسبی ژن *NPY* را به میزان ۰/۵۳ برابر افزایش داد که این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). پپتید۲۳۴ بیان نسبی ژن *NPY* را در مقایسه با گروه سالین به میزان یا ۰/۰۲ 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 سالین به ترتیب به میزان ۰/۰۷ یا ۰/۸۲ برابر افزایش داد که این میزان افزایش در گروه تزریق همزمان کیس‌پپتین/نالوکسان در مقایسه با گروه سالین از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). تزریق همزمان کیس‌پپتین/مورفین بیان نسبی ژن *NPY* را در مقایسه با گروه مرفین به میزان ۰/۶۹ برابر افزایش و در مقایسه با گروه کیس‌پپتین به میزان ۱/۴ برابر کاهش داد که این افزایش یا کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). تزریق همزمان کیس‌پپتین/ نالوکسان بیان نسبی ژن *NPY* را در مقایسه با گروه‌های مرفین، نالوکسون یا کیس‌پپتین به میزان ۱/۸، ۰/۴۵ یا ۰/۱۸ برابر افزایش داد که این افزایش در مقایسه با گروه مرفین یا نالوکسون تنها از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱). تزریق همزمان مرفین/پپتید۲۳۴ بیان نسبی ژن *NPY* را در مقایسه با گروه سالین، مرفین یا پپتید۲۳۴ به ترتیب به میزان ۰/۴۳، ۰/۱۱ یا ۰/۴۱ برابر کاهش داد که این میزان کاهش در مقایسه با سالین یا پپتید۲۳۴ از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$، شکل ۱) ولی این میزان کاهش در مقایسه با مرفین تنها از نظر آماری معنی‌دار نبود.

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 سالین 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 [۵، 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 mRNAی *NPY* مورد بررسی قرار دادند. اثرات تحریکی NPY بر فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادها به طور عمده از طریق گیرنده نوع Y1ی 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

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]



شکل ۱- اثرات تزریق ۵mg/kg مرفین، ۲ mg/kg نالوکسون، ۱nM کیس‌پپتین، ۱nM پپتید۲۳۴ 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 ± انحراف معیار از میانگین ارائه شده است. در هر گروه n = ۵ است و از نظر آماری $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار گزارش شده است. در باندها a: سالین، b: مرفین، c: نالوکسون، d: مرفین و نالوکسون، e: کیس‌پپتین، f: پپتید۲۳۴، g: کیس‌پپتین و مرفین، h: کیس‌پپتین و نالوکسون، i: مرفین و پپتید ۲۳۴ می باشند. a: تفاوت معنی دار با سالین، b: تفاوت معنی دار با مرفین، c: تفاوت معنی دار با نالوکسون، d: تفاوت معنی دار با پپتید ۲۳۴.

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 هیپوتالاموسی دخیل در کنترل فعالیت محور تولیدمثلی از جمله هسته قوسی ، ناحیه پری‌اپتیک میانی (mPOA) و ناحیه برجستگی میانی افزایش می‌دهد [۲۰-۱۶]. نشان داده شده است که نالوکسون میزان بیان mRNAی *NPY* در ناحیه هیپوتالاموس قاعده‌ای میانی را تحریک می‌کند که مسئول کنترل آزادسازی تونیک GnRH/LH در هر دو جنس نر و ماده می‌باشد [۲۰-۱۶] و تزریق داخل بطن مغزی آنتی بادی علیه NPY سبب کاهش قابل ملاحظه LH می شود و تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده NPY اثرات مهاری اپیوئیدها بر فعالیت محور HPG را فعال می‌سازد [۲۰-۱۶]. همچنین مطالعات 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 mRNAی گیرنده کیس‌پپتین (*GPR54* یا *Kiss1r*) بر روی نورون های 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

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

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 ترشح کننده NPY گزارش کرده‌اند که کیس‌پپتین بیان mRNA ی *NPY* را تحریک می کند و آن ممکن است به طور مستقیم در سنتز NPY نقش ایفا کند [۲۰].

مطالعات آزمایشگاه ما نشان داده است که تزریق زیر پوستی مرفین 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 مرفین 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 تولیدمثلی 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 مرفین) در هسته قوسی [۱۵] و اثرات مهاری مرفین بر بیان ژن‌های *NPY* و *Kiss1* در این تحقیق نقش میانجیگری کیس‌پپتین در اعمال اثرات مرفین 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 مرفین در کاهش بیان ژن *NPY* باشد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق همزمان مرفین و کیس‌پپتین سبب افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن *NPY* در مقایسه با مرفین 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 مرفین میانگین بیان نسبی NPY را در مقایسه با سالین یا مرفین 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 مرفین 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 و مرفین بیان نسبی ژن *NPY* در مقایسه با تزریق مرفین 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 مرفین 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 مرفین 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.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

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 luteinising 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, Gourch 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, Leranth 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, Leranth 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.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]

Research paper

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

Homayoun Khazali[*1], Fariba Mahmoudi[2], Mahyar Janhahmadi[3]

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

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-13]