

سازوکارهای اثرات ضد چاقی پپتید 6-GHRP-3-Lys-D، آنتاگونیست گیرنده‌ی GHSR در موش‌های صحرایی

همایون خزعلی، فریبا محمودی

گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده‌ی علوم زیستی، طبقه دوم، انتهای راهرو، جنب دفتر گروه، همایون خزعلی؛ e-mail: khkazali@hotmail.com

چکیده

مقدمه: نورون‌های نوروپپتید Y (NPY) گیرنده‌ی سکروتاکوک هورمون رشد (GHSR-Ia) را بیان می‌کنند. گرسنگی یا تزریق گرلین از راه اتصال به گیرنده‌ی GHSR-Ia و افزایش بیان NPY سبب افزایش دریافت غذا می‌شود. پپتید D-6-GHRP-3-Lys آنتاگونیست گیرنده‌ی GHSR-Ia است و سبب کاهش اشتها و وزن بدن می‌شود. هدف پژوهش حاضر، بررسی سازوکار مولکولی اثرات ضد اشتها 6-GHRP-3-Lys در موش‌های صحرایی با محرومیت غذایی است. **مواد و روش‌ها:** ۱۵ موش صحرایی با محرومیت غذایی به ترتیب سالین یا D-6-GHRP-3-Lys (۲ یا ۲۰ نانومول) را دریافت کردند. میانگین دریافت غذا در یک ساعت بعد از تزریق اندازه‌گیری شد. میانگین غلظت پلاسمایی گرلین با روش RIA تعیین شد. میزان بیان ژن NPY در هیپوتالاموس با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR بررسی شد. ۱۵ موش صحرایی در سه گروه روزانه دو بار سالین یا D-6-GHRP-3-Lys (۲ یا ۲۰ نانومول) را به مدت ۹ روز دریافت کردند و وزن بدن در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۰ تعیین شد. یافته‌ها: محرومیت غذایی سبب افزایش معنی‌دار میانگین غلظت پلاسمایی گرلین، میانگین دریافت غذا و بیان NPY در مقایسه با موش‌های صحرایی سیر شد. دوز ۲ نانومول از D-6-GHRP-3-Lys تغییر معنی‌داری در غلظت گرلین، دریافت غذا و بیان NPY در مقایسه با موش‌های صحرایی با محرومیت غذایی ایجاد نکرد، در حالی که دوز ۲۰ نانومول غلظت گرلین، دریافت غذا و بیان NPY را در مقایسه با موش‌های صحرایی با محرومیت غذایی به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری: D-6-GHRP-3-Lys احتمال دارد اثرات ضد اشتها خود را از راه تداخل با پپتیدهای دخیل در تنظیم همئوستازی انرژی اعمال نماید و احتمال دارد این هدف امیدوارکننده‌ای برای درمان چاقی باشد.

واژگان کلیدی: گرلین، NPY، D-6-GHRP-3-Lys، محرومیت غذایی

دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۳ - دریافت اصلاحیه: ۹۱/۴/۷ - پذیرش مقاله: ۹۱/۴/۱۲

مقدمه

بدن سنتز می‌شود و به عنوان لیگاند آندوژن برای گیرنده‌ی سکروتاکوک هورمون رشد (GHSR-Ia) عمل می‌کند. نشان داده شده سطح پلاسمایی گرلین قبل از غذا افزایش یافته و بعد از غذا کاهش می‌یابد،^۱ و تزریق محیطی یا مرکزی گرلین علاوه بر افزایش ترشح هورمون رشد، از راه افزایش بیان NPY سبب افزایش میزان دریافت غذا و وزن بدن در انسان و جوندگان می‌شود.^{۲،۳} همچنین، پژوهش‌های قبلی مشخص کرده‌اند افزایش یکسانی در میانگین غلظت پلاسمایی گرلین

هیپوتالاموس جایگاه اصلی برای تنظیم اشتها، وزن بدن و بالانس انرژی است و پژوهش روی سطح بیان نوروپپتیدهای هیپوتالاموسی یک هدف فارماکولوژی بالقوه برای درمان چاقی محسوب می‌شود.^۱ گرلین پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای است که به هنگام گرسنگی به طور عمده در معده و به طور متوسطی در هسته‌های هیپوتالاموسی و سایر نواحی

پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی در سطح مجسمه تثبیت شد. بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس، میله مربوط به دندان پیشین فوقانی، ۳/۳ میلی متر پایین تر از خط مربوط به میله های گوشه و نوک کانول در مختصات بطن سوم ($DV=6/5$, $ML=0/0$, $AP=2/3$) قرار گرفت. حیوانات بعد از جراحی به قفس های انفرادی برگردانده شدند و به آنها یک هفته اجازه ی بهبودی داده شد.^{۱۴} بعد از یک هفته دوره ی بهبودی ۱۵ موش صحرایی در ۳ گروه (در هر گروه ۵ =تعداد) بعد از ۲۴ ساعت محرومیت غذایی به ترتیب تزریق درون بطنی - مغزی سالین، ۲ یا ۲۰ نانومول پپتید D-Lys3-GHRP-6 را در حجم ۵ میکرولیتر با استفاده از سرسرنگ دندانپزشکی gauge ۲۷ که از راه لوله ی رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتر وصل شده بود، در ساعت ۹:۳۰-۹:۰۰ دریافت کردند. پپتید D-Lys3-GHRP-6 (Ana Spec- آمریکا) در آب مقطر حل شد. ۵ موش صحرایی در یک گروه نیز که در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند به عنوان گروه کنترل ۵ میکرولیتر سالین را از راه تزریق درون بطنی - مغزی دریافت کردند. مقادیر استفاده شده D-Lys3-GHRP-6 در پژوهش حاضر بر اساس بررسی های پیشین انتخاب شدند که نشان دادند تزریق محیطی یا مرکزی D-Lys3-GHRP-6 سبب کاهش اشتها و وزن بدن در موش هایی با ۱۶ ساعت محرومیت غذایی یا موش های سیر تیمار شده با گرلین می شود.^{۱۳} همچنین برای تعیین اثر D-Lys3-GHRP-6 بر وزن بدن، ۱۵ موش صحرایی در ۳ گروه (در هر گروه ۵ =تعداد) به ترتیب تزریق درون بطنی - مغزی سالین، ۲ یا ۲۰ نانومول پپتید D-Lys3-GHRP-6 را در حجم ۵ میکرولیتر روزانه دو بار در ساعت ۸:۰۰ صبح و ۸ بعد از ظهر به مدت ۹ روز از راه تزریق داخل بطن سوم مغزی دریافت کردند و وزن بدن در روز یک (قبل از تزریق)، ۳، ۷ و ۱۰ (یک روز بعد از آخرین تزریق) تعیین شد.

قبل از شروع اندازه گیری میزان دریافت غذا، موش ها ۲۴ ساعت از غذا محروم شدند ولی دسترسی آزادانه به آب داشتند. وزن اولیه ی غذا تعیین شد و میزان دریافت غذا از راه کم کردن غذای باقیمانده از مقدار غذای اولیه در یک ساعت بعد از تزریق تعیین شد.^۴ در گروه با دسترسی آزاد به غذا نیز میزان دریافت غذا بدون محرومیت غذایی قبل و یک ساعت بعد از تزریق اندازه گیری شد.

به هنگام تزریق داخل صفاقی گرلین یا ۲۴ ساعت محرومیت غذایی ایجاد شده و میزان دریافت غذا در هر دو گروه به میزان یکسانی افزایش می یابد.^۴ نوروپپتید Y (NPY) پپتید اشتهازای بالقوه ی هیپوتالاموسی با ۳۶ اسید آمینه است و تزریق اگزوزن آن میزان دریافت غذا را افزایش داده^۵ و تزریق مزمن آن در نهایت منجر به چاقی می شود.^۶ بیشتر پپتیدهای دخیل در تنظیم بالانس انرژی اثرات خود بر میزان دریافت غذا را از راه تغییرات میزان بیان NPY اعمال می کنند.^{۷-۱۰} پپتید 6-GHRP-D-Lys3 ترکیب سنتتیکی است که به عنوان آنتاگونیست گیرنده ی GHSR-Ia عمل کرده^{۱۱،۱۲} و تزریق محیطی یا مرکزی آن سبب کاهش تخلیه ی معده، میزان دریافت غذا و در نهایت کاهش وزن بدن در موش هایی با محرومیت غذایی یا موش های سیر تیمار شده با گرلین می شود.^{۱۳} هر چند این پژوهش ها پیشنهاد کردند پپتید 6-GHRP-D-Lys3 برای درمان چاقی مفید است، اما هنوز معلوم نیست اثرات ضد اشتها یی آن به دلیل اثرات توکسینی این ترکیب سنتتیک است یا احتمال دارد که آن میزان بیان پپتیدهای دخیل در تنظیم دریافت غذا را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین برای درک بهتر سازوکار عملکرد D-Lys3-GHRP-6 در مسیر اشتها، هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات مقادیر مختلف D-Lys3-GHRP-6 بر میانگین غلظت پلاسمایی گرلین، میانگین دریافت غذا و میزان بیان NPY (بالمقوه ترین پپتید مغزی دخیل در دریافت غذا) در موش های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی است.

مواد و روش ها

موش های صحرایی نر بالغ (۳۵=تعداد) از نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی) به وزن ۲۴۰ الی ۲۵۰ گرم که در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 2 درجه ی سانتی گراد و چرخه ی ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) نگهداری می شدند، برای آزمایش انتخاب شدند. حیوانات به جز هنگام شروع آزمایش که ۲۴ ساعت از غذا محروم شدند در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

عمل جراحی تحت بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلوسین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. کانول ساخته شده از سرسرنگ تزریقی gauge ۲۲ با استفاده از دستگاه استرئوتاکسیک و با کمک سه عدد

نمونه‌های خونی با بریدن سر حیوانات جمع‌آوری شدند. برای جلوگیری از انعقاد سریع نمونه‌های خونی از محلول EDTA استفاده شد. نمونه‌های پلاسمایی با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شده و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان تجزیه آزمایشگاهی برای تعیین غلظت گرلین نگهداری شدند. میانگین غلظت پلاسمایی گرلین با استفاده از کیت سنجش ویژه گرلین موش صحرایی (mediagnost) تهیه شده توسط شرکت تابشیار نور، آلمان) و با استفاده از روش RIA تعیین گردید. حساسیت. درون آزمونی و برون آزمونی کیت گرلین به ترتیب برابر با ۰/۰۴ نانوگرم در میلی‌لیتر، ۵٪ و ۷٪ بود.

بعد از بیهوشی سر حیوان جدا شد. جمجمه شکافته، و مغز بالاافاصله خارج گردید. سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گرفته و برشی به ضخامت ۴ میلی‌متر حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کیاسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی - تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه گردید.^{۱۵} هیپوتالاموس جدا شده به سرعت در نیتروژن مایع فریز، و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری گردید.

نمونه‌های هیپوتالاموسی با استفاده از pureZol و دستگاه bead mill homogenizer هوموژن شدند. RNA مطلق نمونه‌ها با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵٪ براساس دستورالعمل کیت PureZol (Bio Rad, U.S.A.) استخراج شد. رسوب RNA استخراج شده در آب DEPC (شرکت سیناژن) حل شد و تا زمان سنتز cDNA در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت RNA با خواندن میزان جذب RNA در ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. همچنین، میزان خلوص RNA با خواندن میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر و بر اساس نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ محاسبه گردید. این نسبت برای نمونه‌های خالص RNA برابر ۱۵/۲± می‌باشد.

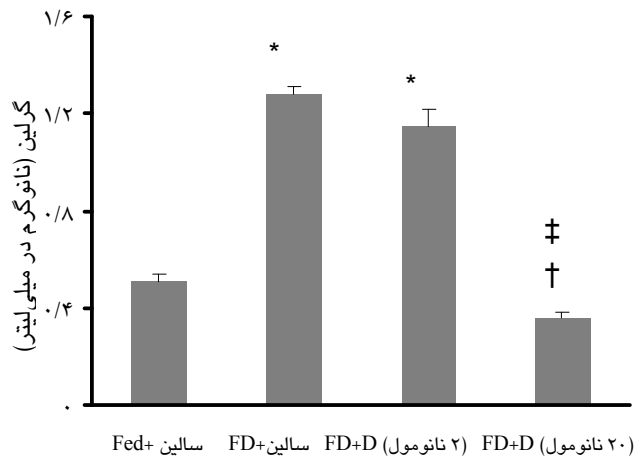
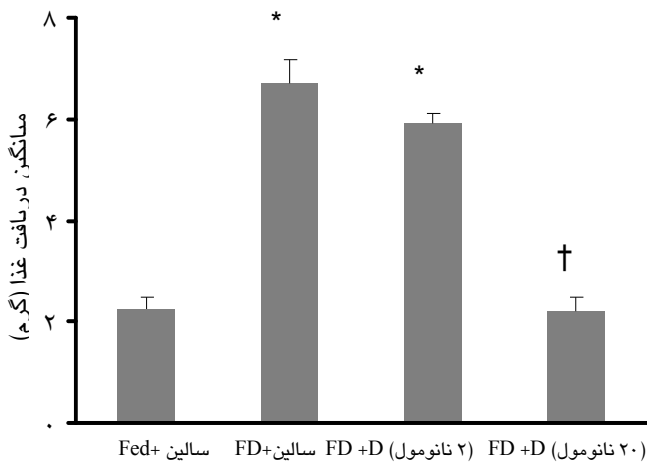
cDNA تک رشته‌ای با استفاده از ۵ میکروگرم از RNA مطلق، پرایمر پلی تیمین، آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA و کیت سنتز cDNA (مالزی، vivantis) بر اساس دستورالعمل کیت توسط دستگاه ترمال سایکلر (آمریکا، Bio RAD) سنتز شد. از آنجا که β -اکتین به طور پیوسته در بافت‌های مختلف از جمله مغز سنتز می‌شود. تعیین سطح mRNA آن توسط روش RT-PCR نیمه کمی برای طبیعی نمودن نمونه‌های mRNA نوروپپتید Y استفاده شد. برای

انجام PCR نمونه‌های cDNA برای ۳۳ چرخه‌ی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل (۲ میکرولیتر) cDNA template، (۵ mM MgCl₂ میکرولیتر) بافر ۱۰X PCR، (۱/۵ میکرولیتر) ۵۰ mM dNTP Mix، (۱ میکرولیتر) ۱۰ mM، (۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها) پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس ۱۰۰ میکرومولار، (۰/۲۵ میکرولیتر) DNA Polymerase ۱/۲۵ U Taq، (۲۸/۲۵ میکرولیتر) آب استریل بر حسب دستورالعمل کیت PCR (آمریکا، Bio RAD) و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (آمریکا، Bio RAD) تشدید ژنی شدند. توالی‌های الیگونوکلوئیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی‌سنس β -اکتین و NPY به ترتیب برابر با 5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' and β -actin antisense: 5'-GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA-3'; NPY sense: 5'-TAGGTAACAAACGAATGGGG-3' and NPY antisense: 5'-AGGATGAGATGAGATGTGGG-3' است.^{۱۶،۱۷} محصولات β -اکتین و NPY به دست آمده از تشدید ژنی به ترتیب ۵۱۱ و ۲۵۱ جفت بازی هستند. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ آنالیز شدند. تراکم باندها با رنگ-آمیزی اتیدیوم بروماید نمایان شده و توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شدند. یافته‌های به دست آمده از نرم‌افزار ImageJ به صورت واحدهای اختیاری بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: یافته‌های به دست آمده به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون جفت نشده، آزمون آنالیز مقادیر تکراری (repeated measurement analysis)، آزمون آنووا و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ آنالیز شدند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون پست تست توکی بررسی شد. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده یافته‌ها با $P < 0/05$ معنی‌دار گزارش شدند.

یافته‌ها

میانگین غلظت پلاسمایی گرلین در موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی نسبت به موش‌های صحرایی با دسترسی آزاد به غذا به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر مقادیر مختلف 6-GHRP- D-Lys3 بر میانگین غلظت پلاسمایی گرلین در موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی (در هر گروه ۵ = تعداد) Fed: با دسترسی آزاد به غذا، FD: ۲۴ ساعت محرومیت غذایی، * در مقایسه با گروه سالین با دسترسی آزاد به غذا، † در مقایسه با گروه سالین با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی و گروه ۲ نانومول 6-GHRP- D-Lys3، ‡ مقایسه‌ی گروه (۲۰ نانومول) 6-GHRP- D-Lys3 با گروه سالین با دسترسی آزاد به غذا ($P < 0.05$)، میانگین \pm انحراف معیار).

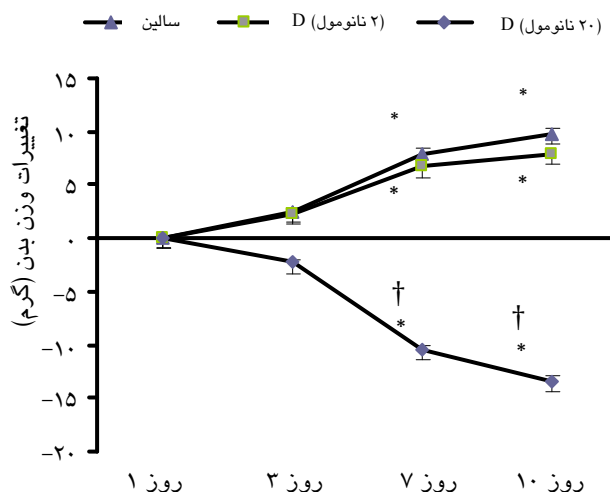
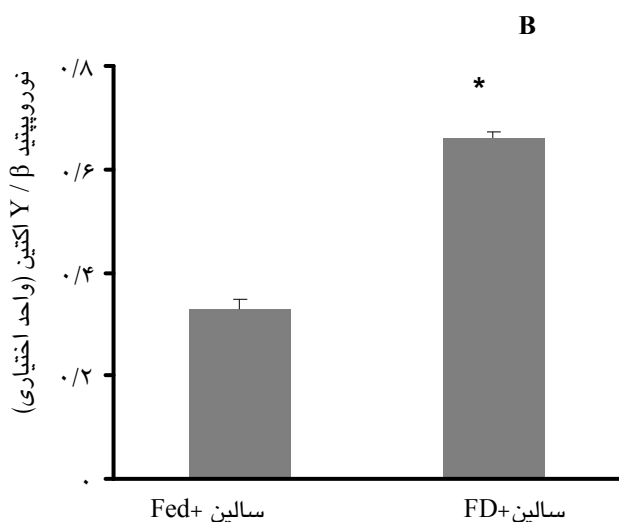
نمودار ۲- اثر مقادیر مختلف 6-GHRP- D-Lys3 بر میانگین دریافت غذا در یک ساعت بعد تزریق در موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی (در هر گروه ۵ = تعداد) Fed: با دسترسی آزاد به غذا، FD: ۲۴ ساعت محرومیت غذایی، * در مقایسه با گروه سالین با دسترسی آزاد به غذا، † در مقایسه با گروه سالین با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی و گروه ۲ نانومول 6-GHRP- D-Lys3 ($P < 0.05$)، میانگین \pm انحراف معیار).

دوز ۲ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 میانگین غلظت پلاسمایی گرلین را در مقایسه با موش‌هایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی به طور معنی‌داری کاهش نداد، در حالی‌که در این گروه میانگین غلظت پلاسمایی گرلین در مقایسه با موش‌هایی با دسترسی آزاد به غذا به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. دوز ۲۰ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 میانگین غلظت پلاسمایی گرلین را در مقایسه با موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی به طور معنی‌داری کاهش داد. مقایسه‌ی بین گروه موش‌های صحرایی با دسترسی آزاد به غذا و گروه (۲۰ نانومول) 6-GHRP- D-Lys3 نشان داد که از نظر میانگین غلظت پلاسمایی گرلین بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به طوری که میانگین غلظت گرلین در گروه (۲۰ نانومول) 6-GHRP- D-Lys3 به طور معنی‌داری پائین‌تر از گروه موش‌های صحرایی با دسترسی آزاد به غذا بود ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

دوز ۲ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 میانگین دریافت غذا در یک ساعت بعد از تزریق را در مقایسه با موش‌هایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی به طور معنی‌داری کاهش داد. مقایسه‌ی بین گروه موش‌های صحرایی با دسترسی آزاد به غذا و گروه (۲۰ نانومول) 6-GHRP- D-Lys3 نشان داد بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین دریافت غذا وجود ندارد ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

در تمام گروه‌ها، میانگین وزن بدن در روز ۷ و ۱۰ در مقایسه با روز یک (قبل از تزریق) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (نمودار ۳). دوز ۲ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 میانگین وزن بدن را در مقایسه با گروه سالین به طور معنی‌داری تغییر نداد، در حالی‌که دوز ۲۰ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 میانگین وزن بدن را در مقایسه با گروه سالین به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

میانگین دریافت غذا در یک ساعت بعد از تزریق در موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی نسبت به موش‌هایی با دسترسی آزاد به غذا به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (نمودار ۲).



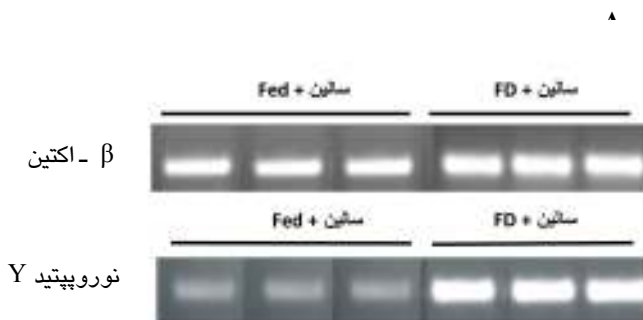
نمودار ۴- فراوانی سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی نسبت به رت‌هایی با دسترسی آزاد به غذا. قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و NPY تشدید شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B میانگین سطح NPY در هر گروه (۵ = تعداد) را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β mRNA -اکتین برای نرمال کردن نتایج NPY استفاده شده است. یافته‌ها به صورت واحدهای اختیاری ارایه شده است ($P < 0.05$ + meam, SEM).

نمودار ۳- اثر تزریق مکرر مقادیر مختلف D-Lys3-GHRP-6 بر میانگین وزن بدن (در هر گروه ۵ = تعداد). * در مقایسه با روز یک (قبل تزریق)، † در مقایسه با گروه سالین ($P < 0.05$ ، میانگین ± انحراف معیار).

دوز ۲ نانومول از پپتید D-Lys3-GHRP-6 فراوانی سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌هایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی را در مقایسه با گروه سالین با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی به طور معنی‌داری تغییر نداد، در حالی‌که دوز ۲۰ نانومول از پپتید D-Lys3-GHRP-6 فراوانی سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس را در مقایسه با گروه سالین به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$) (شکل A ۵).

فراوانی سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌هایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی نسبت به موش‌هایی با دسترسی آزاد به غذا به طور چشمگیری بالاتر است. سطح β mRNA -اکتین (که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است) به میزان نسبی بالا و سطح یکسانی در هیپوتالاموس موش‌هایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی و موش‌هایی با دسترسی آزاد به غذا بیان شده است (شکل A ۴).

شکل B ۴ آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای به دست آمده از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به دست آمده از ۵ موش در هر گروه) را نشان می‌دهد. اگر چه یافته‌های نشان داده شده در شکل B ۴ تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند، ولی همان‌طور که در شکل B ۴ ملاحظه می‌شود سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی نسبت به موش‌هایی با دسترسی آزاد به غذا به طور معنی‌داری بالاتر است (شکل B ۴).

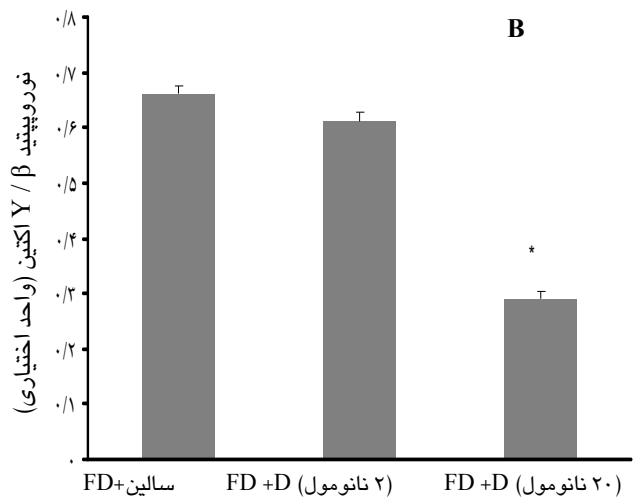


سبب افزایش میانگین غلظت پلاسمایی گرلین شد که این یافته همسو بر پژوهش‌های پیشین است، و که افزایش یکسانی را در میانگین غلظت پلاسمایی گرلین به هنگام تزریق محیطی گرلین یا ۲۴ ساعت محرومیت غذایی گزارش کردند همچنین و نشان دادند که در هر دو گروه میانگین دریافت غذا به میزان یکسانی افزایش می‌یابد.^۴ در پژوهش حاضر مشخص شد که ۲۴ ساعت محرومیت غذایی سبب افزایش میانگین دریافت غذا و میزان بیان NPY شد که این یافته نیز همسو بر پژوهش‌های پیشین است و مشاهده گردید گرسنگی یا گرلین از راه گیرنده‌ی GHSR-Ia سبب افزایش بیان NPY و در نتیجه دریافت غذا می‌شوند.^{۱۸-۲۲} همچنین، مشخص شده اثرات اشتهازایی گرلین با تزریق آنتی‌بادی‌های ضد NPY یا آنتاگونیست‌های NPY بلوکه می‌شود.^{۲۳}

تزریق داخل بطن سوم مغزی 6-GHRP- D-Lys3 سبب کاهش میانگین دریافت غذا و وزن بدن در موش‌های صحرایی شد. این یافته همسو بر یافته‌های پیشین است که نشان دادند تزریق محیطی یا مرکزی 6-GHRP- D-Lys3 سبب کاهش اشتها و وزن بدن در موش‌ها می‌شود.^{۱۶} همچنین، در پژوهش حاضر نشان داده شد 6-GHRP- D-Lys3 سبب کاهش میانگین غلظت پلاسمایی گرلین شد، که این کاهش در سطح گرلین پلاسمای می‌تواند دلیل قابل قبولی برای اثر مهارى 6-GHRP- D-Lys3 بر دریافت غذا باشد. زیرا به طور آشکار نشان داده که هنگام گرسنگی گرلین به طور عمده توسط معده و به طور متوسطی توسط هسته‌های هیپوتالاموسی سنتز و آزاد شده و از راه اتصال به گیرنده‌ی GHSR-Ia واقع روی نورون‌های NPY و در نتیجه افزایش بیان NPY سبب افزایش دریافت غذا و وزن بدن می‌شود،^{۴,۲۳} در حالی‌که میانگین غلظت پلاسمایی گرلین بعد از مصرف غذا یا تزریق داخل وریدی گلوکز کاهش می‌یابد.^{۲,۲۴}

همچنین، در پژوهش حاضر سازوکار مولکولی عملکرد مهارى 6-GHRP- D-Lys3 در مسیر اشتها بررسی شد. دوز ۲۰ نانومول 6-GHRP- D-Lys3 سبب کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن NPY شد. مشاهده گردیده NPY مهم‌ترین محرک برای افزایش دریافت غذا بوده و نورون‌های NPY در هسته‌های آرکونت (ARC) هیپوتالاموس به میزان بالایی گیرنده‌ی گرلین یعنی گیرنده‌ی GHSR-Ia را بیان می‌کند^{۵,۶,۲۵} به طور کامل ثابت شده بیشتر پپتیدهای محیطی و مرکزی دخیل در تنظیم اشتها و وزن بدن از جمله گرلین، لپتین، انسولین و

شکل ۵B آنالیز نیمه کمی تراکم باندهای به دست آمده از نرم‌افزار ImageJ (میانگین داده‌های به دست آمده از ۵ موش صحرایی در هر گروه) را نشان می‌دهد. اگر چه یافته‌های نشان داده شده در شکل ۵B تخمین‌های نسبی را نشان می‌دهند، ولی همان‌طور که در شکل ۵B ملاحظه می‌شود سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌هایی که دوز ۲ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 را دریافت کردند، نسبت به گروه سالین به معنی‌داری تغییر نکرد. در حالی‌که سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌هایی که دوز ۲۰ نانومول از پپتید 6-GHRP- D-Lys3 را دریافت کردند، نسبت به گروه سالین به معنی‌داری کاهش نشان داد (شکل ۵B).



نمودار ۵- فراوانی سطح NPY mRNA در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی که مقادیر ۲ یا ۲۰ نانومول از 6-GHRP- D-Lys3 را دریافت کردند نسبت به موش‌های با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی. قسمت A الکتروفورز ژل آگارز برای ژن‌های β-اکتین و NPY تشدید شده توسط روش نیمه کمی RT-PCR را نشان می‌دهد. قسمت B میانگین سطح NPY در هر گروه (۵ = تعداد) را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار ImageJ کمی شده است. cDNA تشدید شده از β mRNA- اکتین برای طبیعی کردن یافته‌های NPY استفاده شده است. یافته‌ها به صورت واحدهای اختیاری ارائه شده است (P < 0.05، میانگین ± انحراف معیار)

بحث

در پژوهش حاضر بررسی شد آیا اثرات ضد اشتهاى آنتاگونیست گیرنده GHSR-Ia به دلیل اثرات توکسینی این پپتید است یا آن ممکن است در تنظیم میزان بیان پپتیدهای دخیل در هومئوستازی انرژی دخالت داشته باشد. یافته‌ها نشان داد ۲۴ ساعت محرومیت غذایی در موش‌های صحرایی

بتوان با قاطعیت بیشتر درباره اثرات ضد چاقی ترکیب سنتتیک D-Lys3- GHRP-6 صحبت کرد.

در کل یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پپتید سنتتیک D-Lys3- GHRP-6 سبب کاهش میانگین غلظت پلاسمایی گرلین، کاهش میانگین دریافت غذا در یک ساعت بعد از تزریق و کاهش میزان بیان NPY در موش‌های صحرایی با ۲۴ ساعت محرومیت غذایی شد. یافته‌های به دست آمده این فرضیه را تقویت نمود که اثرات ضد اشتهازایی D-Lys3- GHRP-6 احتمال دارد به دلیل بر هم‌کنش این ترکیب با پپتیدهای دخیل در تنظیم هومئوستازی انرژی باشد.

سپاسگزاری: به این وسیله از همکاری سرکار خانم دکتر بهزادی، راهنمایی‌های سرکار خانم دکتر خداقلی و سرکار خانم نگار قادرنژاد از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی به دلیل همکاری با برش‌گیری مغزی و تکنیک‌های مولکولی کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

غیره اثرات تحریکی یا مهارى خود بر میزان دریافت غذا را به ترتیب از راه افزایش یا کاهش بیان NPY اعمال می‌کنند.^{۴، ۷-۱۰} هر چند در پژوهش حاضر مشخص شد که گیرنده‌ی GHSR-1a (یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های دخیل در میانجی‌گری اثرات گرسنگی یا هورمون گرلین بر افزایش دریافت غذا) می‌تواند میزان بیان NPY و سطح پلاسمایی گرلین را تحت تاثیر قرار دهد و این مشاهدات این فرضیه را تقویت می‌کنند که بلوک کردن گیرنده‌ی GHSR-1a ممکن است هدف امیدوارکننده‌ای برای درمان چاقی باشد. ولی برای درک بهتر اثرات فارماکولوژیکی D-Lys3- GHRP-6 پیشنهاد می‌شود که ارتباط این پپتید سنتتیک با میزان بیان ژن‌های α MSH/CART و CRH، و همچنین سطح پلاسمایی لپتین و انسولین (که همگی از مهم‌ترین فاکتورهای مهارى بر میزان دریافت غذا هستند و همواره بین سطح پلاسمایی یا میزان بیان آنها با سطح پلاسمایی یا میزان بیان گرلین و NPY رابطه معکوس وجود دارد) بررسی شود.^{۴، ۷-۱۰} تا

References

1. Ferreira Sousa-Ferreira L, Garrido M, Nascimento-Ferreira I, Nobrega C, Santos-Carvalho A, Alvaro AR, et al. Moderate long-term modulation of neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus induces energy balance alterations in adult rats. *PLoS One* 2011; 6: e22333.
2. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 19-21.
3. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.
4. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2540-7.
5. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-71.
6. Beck B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Phil Trans R Soc B* 2006; 361: 1159-85.
7. Klob MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 2007; 8: 21-34.
8. Sato I, Arima H, Ozaki N, Watanabe M, Goto M, Hayaishi M, et al. Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate through GABAergic systems. *J Neurosci* 2005; 25: 8657-64.
9. Thorsell A, Caberlotto L, Rimondini R, Heilig M. Leptin suppression of hypothalamic NPY expression and feeding but not amygdala NPY expression and experimental anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 425-30.
10. McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: 695-703.
11. Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, et al. Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-1a receptor. *Endocrinology* 2005; 146: 3836-42.
12. Holst B, Cygankeiwicz A, Halkjaer JT, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor- identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2201-10.
13. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52: 947-52.
14. Lewis MJ, Johnson DF, Waldman D, Leibowitz SF, Hoebel BG. Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 1822-8.
15. Kumano S, Matsumoto H, Takatsu Y, Noguchi J, Kitada C, Ohtaki T. Changes in hypothalamic expression levels of galanin like peptide in rat and mouse models support that it is a leptin target peptide. *Endocrinology* 2003; 144: 2634-43.
16. Li MD, Kane JK, Parker SL, McAllen K, Matta SG, Sharp BM. Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 2000; 867: 157-64.
17. Sucajtyś- Szulc E, Karbowska J, Kochan Z, Wolyniec W, Chmielewski M, Rutkowski B, et al. Up-regulation of NPY gene expression in hypothalamus of rats with

- experimental chronic renal failure. *Biochim et Biophys Acta* 2007; 1772: 26-31.
18. Swart I, Overton JM, Houpt TA. The effect of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels. *Peptides* 2001; 22: 2175-9.
19. de Rijke CE, Hillebrand JJ, Verhagen LA, Roeling TA, Adan RA. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *J Mol Endocrinol* 2005; 35: 381-90.
20. Brady LS, Smith, MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-Restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 1990; 52: 441-7.
21. Goto M, Arima H, Watanabe M, Hayashi M, Banno R, Sato I, et al. Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* 2006; 147: 5102-09.
22. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2438-43.
23. Keen- Rhinehart E, Bartness TJ. NPY Y1 receptor is involved in ghrelin and fasting-induced increases in foraging, food hoarding and food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: 1728- 37.
24. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240-4.
25. Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty- Colomer LA, Fontanaud P, Molino F, et al. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PloS One* 2010; 5: e 9159.

Original Article

The Anti-Obesity Effect of D-Lys3- GHRP-6 Peptide, GHSR Receptor Antagonist in Rats

Khazali H- Mahmoudi F

Department of Physiology, Faculty of Biology Science, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran

e-mail: hkhazali@hotmail.com

Received: 11/04/2012 Accepted: 02/07/2012

Abstract

Introduction: Neuropeptide Y (NPY) neurons express growth hormone secretagogues receptor (GHSR-1a). Fasting or ghrelin increases food intake by stimulating NPY gene expression via GHSR-1a. D-Lys3 -GHRP-6, a ghrelin receptor antagonist, decreases food intakes and body weight. The present study aimed to investigate the molecular mechanism of the anorexigenic effect of D-Lys3 -GHRP-6 in food deprived rats. **Materials and Methods:** Fifteen food deprived rats (3 groups) received central injections of saline or D-Lys3 -GHRP-6 (2 or 20nmol) respectively and mean food intake was measured at one hour after injections. Mean plasma ghrelin concentration was measured by RIA, and NPY gene expression was determined by semi quantitative RT-PCR in the hypothalamus. Fifteen rats in three groups, received central injection of saline or initiations and on the D-Lys3 -GHRP-6 (2 or 20nmol) twice daily for 9 days respectively. Body weight was determined at third, 7th and 10th day of the experiment. **Results:** Mean plasma ghrelin concentration, mean food intake and NPY gene expression significantly increased in food deprived rats compared to fed animals. D-Lys3 -GHRP-6 (2 nmol) did not significantly change ghrelin, food intake and NPY mRNA levels, compared to the food deprived rats. However D-Lys3 -GHRP-6 (20 nmol) significantly decreased ghrelin, food intake and NPY mRNA level compared to food deprived group. **Conclusion:** Results showed that D-Lys3 -GHRP-6 may exert its anorexigenic effect on food intake by influencing the expression of peptides involved in the regulation of energy homeostasis, and may be suggested for the treatment of obesity.

Keywords: Ghrelin, NPY, D-Lys3 -GHRP-6, Food deprivation