

Effects of Dopamine and L-dopa on Ghrelin Gene Expression in the Hypothalamus and Ovary in a Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model

Leila Nezhaddadgar¹, Fariba Mahmoudi², Homayoun Khazali³

1.MSc student, Department of Biology / Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5647-6882

2.Associate Professor, Department of Biology / Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding Author), Tel: +98-45-31505193, Email: f.mahmoudi@uma.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-6092-1352

3.Associate Professor, Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran ORCID ID: 0000-0002-3231-0463

ABSTRACT

Background and Aim: In healthy people, dopamine stimulates ghrelin secretion. The level of dopamine release and ghrelin is lower in the patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). In the present study, we investigated the effects of dopamine and L-dopa on relative gene expression of ghrelin in PCOS model rats.

Materials and Methods: In the first step of the study, PCOS was induced in 25 female Wistar rat (*Rattus norvegicus*) by injection of estradiol. Then, the rats received saline, dopamine (5µg), L-dopa (5µg) or simultaneous injections of sulpride (10µg/kg), SCH23390 hydrochloride (10µg/kg) and dopamine or L-dopa respectively via third cerebral ventricular. In the second part of the study, 15 PCOS rats received saline L-dopa (100mg/kg) or dopamine (50mg/kg) intraperitoneally. Hypothalamic and ovarian samples were dissected. Mean relative ghrelin gene expression was determined by real-time-PCR method.

Results: Mean relative gene expression of ghrelin significantly decreased in the hypothalamus and ovary of the rats with PCOS compared to those in the intact rats. Intraventricular injection of dopamine or L-dopa significantly increased the hypothalamic ghrelin gene expression in comparison to that in the rats in the PCOS group. Dopamine or L-dopa did not significantly increase the gene expression of ovarian ghrelin in comparison to that in PCOS group. Injections of sulpride and SCH23390 significantly blocked the stimulatory effects of dopamine or L-dopa on the ghrelin gene expression in hypothalamus compared to those in the dopamine or L-dopa group.

Conclusion: The dopaminergic pathway may be involved in increasing ghrelin gene expression extremely via hypothalamic level in PCOS condition.

Keywords: Dopamine, L-dopa, Ghrelin, Polycystic ovary syndrome.

Received: Mar 21, 2022

Accepted: Nov 28, 2022

How to cite the article: Leila Nezhaddadgar, Fariba Mahmoudi, Homayoun Khazali. Effects of Dopamine and L-dopa on Ghrelin Gene Expression in the Hypothalamus and Ovary in a Polycystic Ovarian Syndrome Rat Model. *ŞJKU* 2024;28(6):1-11.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and build up the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثرات دوپامین و ال‌دوپا بر بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس و تخمدان در مدل موش صحرایی سندروم تخمدان پلی کیستیک

لیلا نژادادگر^۱، فریبا محمودی^۲، همایون خزعلی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی/دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. کد ارکید: ۶۸۸۲-۵۶۴۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی/دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، پست الکترونیک: f.mahmoudi@uma.ac.ir، تلفن: ۰۴۵-۳۱۵۰۵۳۹۴، کد ارکید: ۱۳۵۲-۶۰۹۲-۰۰۰۱-۰۰۰۰
۳. دانشیار، گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۲۳۱-۰۴۶۳

چکیده

زمینه و هدف در افراد سالم دوپامین اثرات تحریکی بر ترشح گرلین دارد. سطوح آزادسازی دوپامین و گرلین در افراد مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) پایین تر است. در تحقیق حاضر، اثرات دوپامین و ال‌دوپا بر بیان ژن گرلین در موش‌های صحرایی PCOS بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در قسمت اول تحقیق، در ۲۵ موش صحرایی ماده از نژاد ویستار (*Rattus norvegicus*) با تزریق استرادیول PCOS ایجاد شد. سپس، موش‌های صحرایی PCOS به ترتیب سالین، ۵ میکروگرم دوپامین، ۵ میکروگرم ال‌دوپا یا تزریق همزمان ۱۰ میکروگرم سولپرید، ۱۰ میکروگرم SCH23390 و ۵ میکروگرم دوپامین یا ال‌دوپا را از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. در قسمت دوم تحقیق، ۱۵ موش صحرایی PCOS به ترتیب سالین، ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ال‌دوپا یا ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم دوپامین را به طور داخل صفاقی دریافت کردند. تخمدان و هیپوتالاموس‌ها جداسازی شدند. بیان ژن گرلین با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (ریل تایم-PCR) اندازه گیری شد.

یافته‌ها: میانگین بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس و تخمدان گروه PCOS نسبت به موش‌های صحرایی سالم کاهش معنی دار پیدا کرد. تزریق داخل مغزی دوپامین یا ال‌دوپا سبب افزایش معنی دار بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس در مقایسه با گروه PCOS شد. تزریق داخل صفاقی دوپامین یا ال‌دوپا بیان ژن گرلین را در تخمدان در مقایسه با گروه PCOS به طور معنی داری افزایش نداد. تزریق سولپرید و SCH23390 اثرات تحریکی دوپامین یا ال‌دوپا بر بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس را در مقایسه با گروه دوپامین یا ال‌دوپا بلوکه کرد.

نتیجه گیری: مسیر دوپامینرژیک می‌تواند به طور عمده از طریق سطح هیپوتالاموسی، در افزایش بیان ژن گرلین در شرایط PCOS دخالت داشته باشد.

کلمات کلیدی: دوپامین، ال‌دوپا، گرلین، سندروم تخمدان پلی کیستیک

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱/۳۱-اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۹/۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۷

مقدمه

سندروم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) یکی از مهم ترین اختلالات تولیدمثل و غالب ترین دلیل اختلال در تخمک گذاری و ناباروری زنان است. تظاهرات اصلی PCOS هیپرآندروژنیسم، مقاومت به انسولین و اختلال در تولیدمثل و سوخت و ساز بدن است (۱). اختلال در ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین ها (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) و هورمون لوتئینه (Luteinizing Hormone, LH) یکی از مهم ترین دلایل ناباروری و عدم تخمک گذاری در PCOS است (۱). ترشح خود این هورمون ها تحت کنترل بسیاری از هورمون های محیطی و نوروپپتیدهای داخل هیپوتالاموسی در بالادست نورون های GnRH از جمله گرلین و دوپامین است.

دوپامین یکی از مهم ترین نوروترانسمیترهای کاتاکول آمینی مغز است که هنگام تزریق محیطی به علت عدم توانایی عبور از سد خونی- مغزی نمی تواند به طور مستقیم بر روی فعالیت نورون های داخل هیپوتالاموسی اثر بگذارد درحالی که پیش سازهای دوپامین (تیروزین یا ال دوپا)، آگونیست ها و آنتاگونیست های سنتتیک دوپامین توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارند (۲). نورون های دوپامینرژیک در نواحی مختلف مغز از جمله در هیپوتالاموس در هسته های دور بطنی و قوسی قرار گرفته است و انشعابات آکسون نورون های دوپامینرژیک به نواحی متعدد مغز ارسال می شود (۳). اثرات دوپامین در سیستم عصبی مرکزی توسط گیرنده های خانواده D_1 -like و D_2 -like like میانجیگری می شود که D_5 و D_1 جزء خانواده D_1 -like هستند و D_2 و D_3 و D_4 جزو خانواده D_2 -like هستند (۴-۵). مطالعات پیشین نشان داده است که هر دو گروه گیرنده D_1 -like و D_2 -like دوپامین بر روی ۵۰٪ نورون های GnRH بیان می شوند و دوپامین از طریق هر دو گروه گیرنده در مهار فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادها نقش دارد (۲). به عبارتی دوپامین در اعمال اثرات

خود بر محور تولیدمثلی از اثرات هم افزایی مسیرهای پیام رسانی مربوط به هر دو گروه گیرنده خود استفاده می کند به همین دلیل در این تحقیق از آنتاگونیست هر دو گروه گیرنده استفاده شده است. (۲). ال دوپا، از ال تیروزین توسط آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز تولید می شود و آن به راحتی از سد خونی- مغزی عبور می کند. هنگامی که ال دوپا وارد سیستم عصبی مرکزی می شود توسط آنزیم ال آمینوآسید دهیدروکسیلاز به دوپامین تبدیل می شود. علاوه بر سیستم عصبی مرکزی، ال دوپا در سیستم عصبی محیطی نیز به دوپامین تبدیل می شود (۶).

گرلین پپتید ۲۸ اسید آمینه ای است که به طور عمده در معده و هیپوتالاموس سنتز شده و آن از طریق اتصال به گیرنده $GHS-R1a$ اثرات فیزیولوژیکی خود را اعمال می کند (۷). همچنین، گرلین و گیرنده آن در تخمدان بیان می گردد که این یافته پیشنهاد می کند که گرلین علاوه بر اثرات مرکزی ممکن است به طور موضعی و محیطی در کنترل عملکرد تخمدان دخالت داشته باشد (۷). گرلین اثرات مهاری بر فعالیت محور تولیدمثلی داشته و سبب مهار ترشح هورمون های GnRH و LH می شود (۷). همچنین در تایید اثرات مهاری گرلین بر فعالیت محور تولیدمثلی در جوندگان نشان داده شده است که گرلین کمترین سطح بیان را در فاز پرواستروس و بیشترین سطح بیان را در فاز دی استروس (که در این فاز ترشح هورمون های GnRH و LH پایین تر است) دارد (۷-۸). یکی از دلایل اصلی اختلال در ناباروری افراد PCOS، بالاتر بودن میزان ترشح هورمون های GnRH و LH می باشد. همچنین در افراد PCOS ثابت شده است که سطوح پلاسمایی گرلین پایین تر می باشد (۷-۹) و دوپامین اثرات مهاری بر ترشح هورمون های GnRH/LH دارد (۲). همچنین در موش های صحرائی نر سالم نشان داده شده است که دوپامین سبب تحریک ترشح گرلین می گردد (۱۰). افزایش ترشح هورمون لوتئینه کننده (LH) یا افزایش نسبت هورمون لوتئینه کننده (LH) به هورمون محرک فولیکولی (FSH) یکی از مهم ترین دلایل در ایجاد سندروم تخمدان

صحرائی دسترسی کامل داشتند. دمای محل نگهداری حیوانات 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد بود و حیوانات همواره تحت دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند.

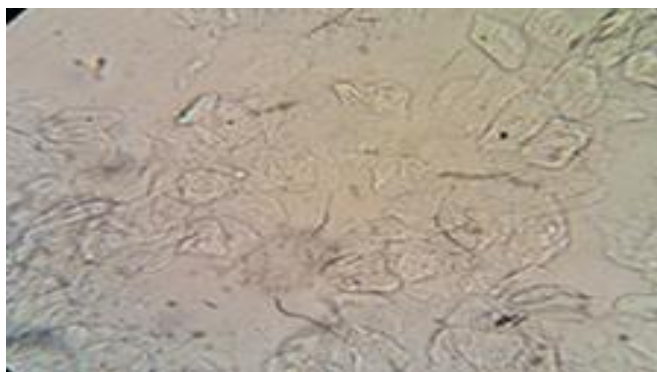
بررسی واژیناسیون و القای سندروم تخمدان پلی-

کیستیک: با بررسی نمونه‌های واژنی موش‌های صحرائی دو دور سیکل استروس مرتب به ترتیب پرو استروس، استروس، مت استروس و دی استروس مشاهده شد. برای القای PCOS، حیوانات در مرحله استروس، استرادیول والرات (پودر تهیه شده از شرکت ابوریحان، ایران) با دوز ۲ میلی‌گرم در ۰/۲ میلی‌لیتر روغن کنجد (شرکت باریج اسانس، ایران) را به صورت تزریق داخل عضلانی دریافت کردند. گروه کنترل سالم تزریق داخل عضلانی ۰/۲ میلی‌لیتر روغن کنجد را دریافت نمود. القای PCOS از روز ۳۰ بعد از تزریق استرادیول والرات بر اساس بررسی‌های واژیناسیون و مشاهده مرحله استروس پایدار و همچنین با برش‌گیری از تخمدان تعدادی از از نمونه‌های تخمدانی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین مورد تایید قرار گرفت (شکل‌های ۱ و ۲). در روز یک و روز ۶۰ بعد از تزریق استرادیول والرات وزن حیوانات سالم و PCOS تعیین گردید.

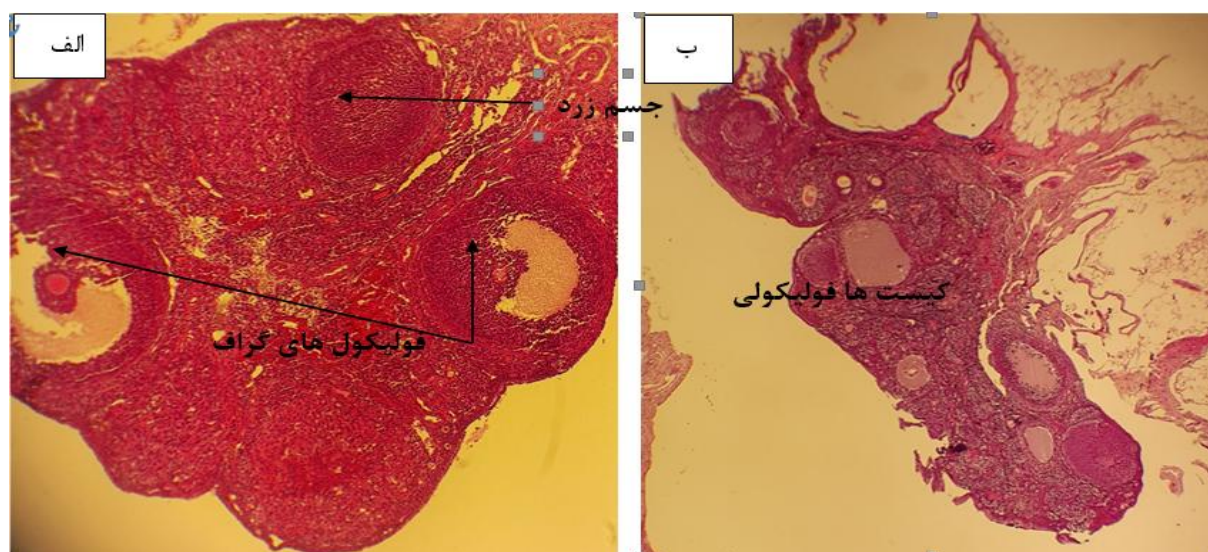
پلی‌کیستیک است و دوپامین و گرلین هر دو سبب مهار ترشح هورمون LH می‌گردند (۲، ۷). از طرفی بر طبق در تحقیق گومز و همکارانش در زنان PCOS نشان داده شده است که آزادسازی میزان دوپامین کاهش می‌یابد (۱۱). بنابراین، با توجه به کاهش آزادسازی دوپامین و کاهش ترشح گرلین در زنان PCOS و نقش تحریکی دوپامین بر ترشح گرلین در موش‌های صحرائی نر، در تحقیق حاضر اثرات دوپامین و ال دوپا برای اولین بار بر بیان ژن گرلین در موش‌های صحرائی PCOS بررسی شد تا مشخص گردد که آیا افزایش فعالیت مسیر دوپامینرژیک می‌تواند ممکن است از طریق افزایش بیان ژن گرلین در کاهش ترشح هورمون LH در افراد PCOS دخالت داشته باشد.

مواد و روش‌ها

واحدهای آزمایشی: این پژوهش از نوع تجربی است و در سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. برای انجام این تحقیق، ۵۰ موش صحرائی ماده نژاد ویستار به وزن ۱۷۰ تا ۲۰۰ گرم خریداری شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در تمامی مدت آزمایش، به آب و غذای مخصوص موش



شکل ۱. مرحله استروس پایدار با مشاهده سلول‌های شاخی در اسمیر واژنی



شکل ۲. برشی از تخمدان. الف. تخمدان سالم، ب. تخمدان سندروم پلی کیستیک

کانول گذاری داخل بطنی و عمل تزریق: حیوانات

با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از کتامین (شرکت آلفاسان، هلند) و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از زایلزین (شرکت آلفاسان، هلند) بیهوش شدند. کانول ساخته شده از سرسنگ تزریقی ۲۲ gauge با استفاده از دستگاه استرئوتاکسیک (Stoelting Co, USA) 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 ($AP = -۰/۸۴$ ، $ML = ۰۰$ ، $DV = ۶/۵$) قرار گرفت (۱۰). حیوانات بعد از جراحی به قفسهای انفرادی برگردانده شدند و به آنها یک هفته اجازه بهبودی داده شد. در بخش اول آزمایش، ۲۵ موش صحرایی PCOS در ۵ گروه ۵تایی به ترتیب سالین، ۵ میکروگرم دوپامین (شرکت سیگما، آمریکا)، ۵ میکروگرم ال دوپا (شرکت سیگما، آمریکا)، تزریق همزمان ۱۰ میکروگرم سولپرید (شرکت سیگما، آمریکا)، ۱۰ میکروگرم SCH23390 هیدروکلراید (شرکت سیگما، آمریکا) و دوپامین یا تزریق همزمان ۱۰ میکروگرم سولپرید، ۱۰ میکروگرم SCH23390 هیدروکلراید و ال دوپا را از طریق

تزریق درون بطن سوم مغزی در حجم ۳ میکرولیتر با استفاده از سرسنگ دندانپزشکی ۲۷ gauge دریافت کردند که از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری وصل شده بود. پنج موش صحرایی سالم در یک گروه به عنوان گروه کنترل سالم ۳ میکرولیتر سالین را از طریق تزریق داخل بطن سوم مغزی دریافت کردند. در بخش دوم آزمایش، همچنین ۱۵ موش صحرایی PCOS در ۳ گروه ۵تایی به ترتیب سالین، ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ال دوپا (شرکت سیگما، آمریکا) یا ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دوپامین (شرکت سیگما، آمریکا) را به صورت تزریق داخل صفاقی در حجم ۰/۵ میلی لیتر دریافت کردند. پنج موش صحرایی سالم در یک گروه به عنوان گروه کنترل سالم ۰/۵ میلی لیتر سالین را از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. تزریق داروها در ساعت ۹:۰۰-۹:۳۰ به مدت دو هفته انجام شد. دوز داروها بر اساس تحقیقات پیشین ن انتخاب شده است (۱۰، ۱۲). در گروه هایی که تزریق داخل صفاقی داروها را دریافت کرده بودند بیان نسبی ژن گرلین در تخمدان برد. در گروه هایی که تزریق داخل بطن سوم مغزی داروها را دریافت کرده بودند بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس بررسی شد.

جداسازی هیپوتالاموس و تخمدان: بعد از بیهوشی حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین و زایلین، نمونه‌های هیپوتالاموسی و تخمدان‌ها بلافاصله جداسازی و فریز شدند. برای منجمد کردن سریع نمونه‌های بافتی از نیتروژن مایع استفاده گردید. سپس نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شد.

بررسی میزان بیان ژن با استفاده از روش Realtime-PCR: نمونه‌های هیپوتالاموسی و تخمدان با استفاده از Purezol هوموژن شدند و RNA مطلق نمونه‌ها بر اساس روش گوانیدین تیوسیانات- فنل- کلروفرم بر طبق دستورالعمل کیت Purezol (Bio Rad co, U.S.A.) استخراج شد. یک میکروگرم از RNA برای سنتز cDNA بر طبق دستورالعمل کیت (Vivantis Co., Malaysia) مورد استفاده قرار گرفت. پس از سنتز cDNA قطعه مورد نظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت مستر میکس سایرگرین (شرکت تاکارا، ژاپن) و با استفاده از دستگاه ریل تایم پی سی آر روتر ژن مدل ۶۰۰۰ (Rotor Gene 6000, Corbette, Korea) تکثیر شدند. برنامه زمانی برای واکنش پی سی آر کمی شامل یک چرخه (۹۵ °C برای ۲ دقیقه) و ۴۰ چرخه (۹۵ °C برای ۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ °C برای ۲۰ ثانیه) بود. پرایمرها از شرکت ژن فناوری ایران تهیه شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی سنس GAPDH و گرلین در

جدول ۱ نشان داده شده است. محصولات GAPDH و گرلین حاصل به ترتیب ۱۲۰ و ۱۳۲ جفت باز هستند. در تحقیق حاضر از ژن کنترل گلیسر آلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده شد و روش محاسبه تغییران میزان بیان ژن بر اساس روش لیواک یعنی کمیت سنتزی نسبی بوده است. میزان بیان mRNA گرلین با استفاده از رنگ سایبر گرین و به کارگیری میزان تکثیر نمونه‌ها (Ct) نسبت به میزان تکثیر ژن کنترل (Ct) بر طبق روش دلتا دلتا سی تی و به کارگیری فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شدند (۱۴-۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری: توزیع نرمال داده‌های حاصل از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف با استفاده از نرم افزار SPSS بررسی و تایید شد. سپس، داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی انجام شد. همچنین نتایج مربوط به وزن حیوانات PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم با استفاده از آزمون T- تست جفت نشده آنالیز شد. نتایج حاصل به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (\pm) SEM ارائه شدند. در تمام آنالیزهای آماری نتایج با $p \leq 0.05$ معنی دار گزارش شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرها.

پرایمر	توالی در جهت ۵' به ۳' (از چپ به راست)
سنس گرلین	AATGCTCCCTTCGATGTTGG
آنتی سنس گرلین	CAGTGGTTACTGTAGCTGG
سنس GAPDH	AAGTTCAACGGCAGTCAAG
آنتی سنس GAPDH	CATACTCAGCACCAGCATCAC

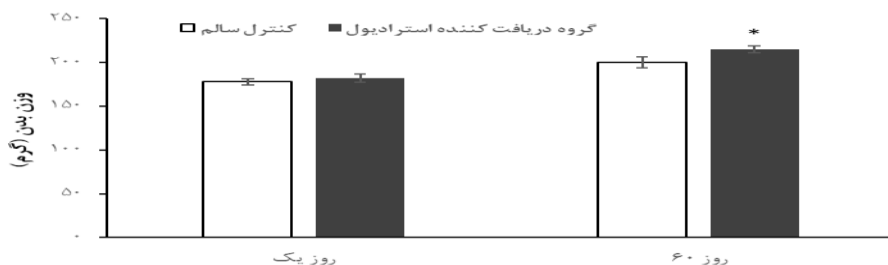
یافته‌ها

گروه‌های دریافت کننده استرادیول والرات در مقایسه با گروه کنترل سالم از نظر آماری تفاوت معنی دار پیدا کرد ($p=0.000$) (نمودار ۱). میانگین بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم

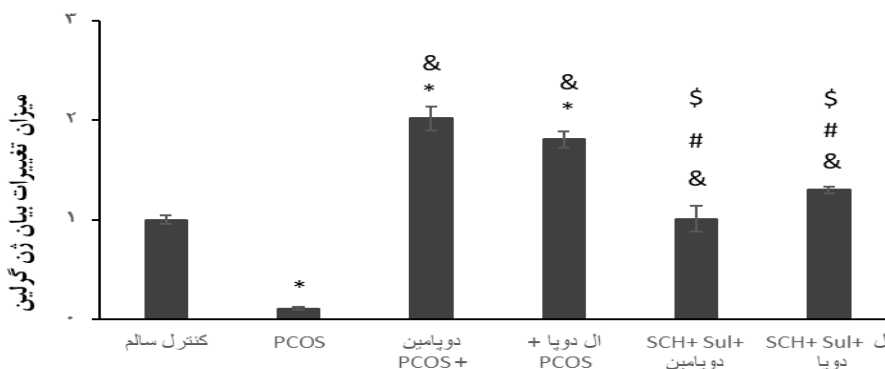
بین میانگین وزن بدن در روز یکم در گروه دریافت کننده استرادیول والرات در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معنی دار وجود نداشت. میانگین وزن بدن در روز ۶۰ در

SCH23390 هیدروکلراید و دوپامین یا ال دوپا در مقایسه با گروه PCOS دریافت کننده دوپامین از نظر آماری به طور معنی داری کاهش یافت ($p=0/000$ یا $p=0/012$) (نمودار ۲). میانگین بیان نسبی ژن گرلین در تخمدان گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش یافت که این میزان کاهش از نظر آماری معنی دار بود ($p=0/000$) (نمودار ۳). تزریق داخل صفاقی ال دوپا یا دوپامین به موش های صحرایی PCOS بیان ژن گرلین در تخمدان را در مقایسه با گروه PCOS از نظر آماری به طور معنی داری افزایش نداد ($p=0/395$ و $p=0/111$) (نمودار ۳).

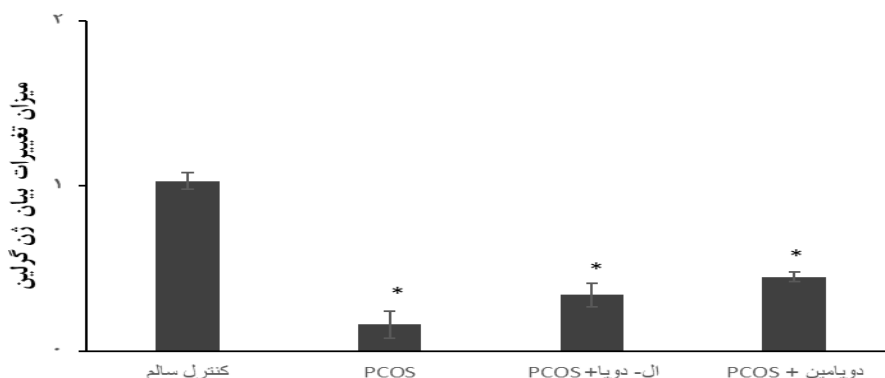
کاهش یافت که این میزان کاهش از نظر آماری معنی دار بود ($p=0/000$) (نمودار ۲) بیان ژن گرلین در گروه های PCOS دریافت کننده تزریق داخل بطن سوم مغزی دوپامین یا ال دوپا در مقایسه با گروه PCOS افزایش یافت که این میزان افزایش در هر دو گروه از نظر آماری معنی دار بود ($p=0/000$) (نمودار ۲). ولی میزان بیان آن در گروه PCOS دریافت کننده تزریق داخل بطن سوم مغزی ال دوپا در مقایسه با گروه PCOS دریافت کننده دوپامین تغییر معنی داری پیدا نکرد ($p=0/497$) (نمودار ۲). بیان ژن گرلین در گروه PCOS دریافت کننده تزریق همزمان سولپرید،



نمودار ۱. میانگین وزن بدن در روزهای یک و ۶۰ در گروه دریافت کننده استرادیول والرات در مقایسه با گروه کنترل سالم. *: در مقایسه با کنترل سالم.



نمودار ۲. اثرات تزریق داخل بطن سوم مغزی دوپامین، ال دوپا یا تزریق همزمان دوپامین، ال دوپا، سولپرید و SCH23390 هیدروکلراید (SCH) بر میزان تغییرات بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس موش های صحرایی مدل PCOS. داده ها با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده ها توسط آزمون تعقیبی توکی انجام شد. تعداد نمونه ها در هر گروه ۵ بوده و نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده است. $P \leq 0/05$ از نظر آماری معنی دار گزارش شده است. *: در مقایسه با گروه کنترل سالم، +: در مقایسه با گروه PCOS، #: در مقایسه با گروه دوپامین + PCOS، †: در مقایسه با گروه ال دوپا + PCOS



نمودار ۳. اثرات تزریق داخل صفاقی ال دوپا و دوپامین بر میزان تغییرات بیان ژن گرلین در تخمدان موش‌های صحرائی مدل PCOS. داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی انجام شد. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۵ بوده و نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده است. $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار گزارش شده است. *: در مقایسه با گروه کنترل سالم.

بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میانگین بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس و تخمدان موش‌های صحرائی مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) نسبت به موش‌های صحرائی سالم کاهش یافت. نتایج حاصل منطبق بر مطالعات پیشین است. در سال ۲۰۰۴، نشان داده شد که سطوح پلاسمایی هورمون گرلین در زنان مبتلا به PCOS نسبت به زنان سالم کاهش چشمگیری پیدا کرد (۹، ۱۵). گرلین، به‌عنوان تنظیم‌کننده بالقوه مهاری در محور تولیدمثل است. ثابت شده است که گرلین از طریق مهار ترشح GnRH/ LH اثرات خود بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادها را اعمال می‌کند (۷). به علاوه، گرلین قادر به مهار تولید تستوسترون در داخل بدن در شرایط آزمایشگاهی است (۱۶). بنابراین یکی از دلایل احتمالی اصلی در افزایش تولید آندروژن‌ها و افزایش نسبت ترشح LH به FSH در افراد PCOS می‌تواند کاهش سنتز گرلین باشد.

یکی از فاکتورهای دخیل در کاهش سطوح گرلین می‌تواند با افزایش تولید آندروژن‌ها در افراد PCOS در ارتباط باشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که بین گرلین و

سطوح بالای آندروژن‌ها همبستگی منفی وجود دارد (۹). استفاده از داروهای ضدآندروژنی از جمله فلوتامید سبب افزایش سطوح پلاسمایی گرلین در زنان PCOS می‌گردد (۱۵). بنابراین ممکن است که سطح بالای آندروژن‌ها در موش‌های صحرائی PCOS در کاهش بیان نسبی ژن گرلین نقش داشته باشد.

کیس‌پیتین می‌تواند فاکتور مهم دیگر برای کاهش بیان و ترشح گرلین در افراد PCOS باشد. نشان داده شده است که بیان ژن کیس‌پیتین و سطوح پلاسمایی آن در PCOS افزایش می‌یابد (۱۷). از طرفی کیس‌پیتین باعث مهار ترشح گرلین می‌شود (۱۰). از این رو احتمال دارد که به‌دنبال افزایش بیان و ترشح کیس‌پیتین در افراد PCOS در میزان بیان ژن گرلین کاهش اتفاق افتد.

دوپامین از جمله نوروترانسمیترهای مهاری مهم در ترشح هورمون‌های GnRH/LH و هورمون‌های جنسی محسوب می‌شود (۲). تحقیقات نشان داده است که میزان آزادسازی دوپامین در بیماران PCOS کاهش می‌یابد (۱۱). اختلال در میزان ترشح گرلین در بیماران PCOS، آنها را در معرض ریسک بالایی از اختلالات ناشی از ترشح بیش از حد هورمون LH و آندروژن‌ها قرار می‌دهد. با توجه به اهمیت

گیرنده GHSR1a (گیرنده گرلین) و گیرنده‌های D₁ و D₂ دوپامینرژیک باهم هم‌مکانی دارند (۲۰). تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده‌های D₁، D₂ و D₃ دوپامینی سبب مهار اثرات اشتهازایی گرلین در موش‌های صحرایی نر می‌گردد (۲۱). در حالی که تزریق گرلین سطوح دوپامین را افزایش داده و سبب افزایش میزان دریافت غذا می‌شود (۲۲). در مجموع، این یافته‌ها تاییدکننده برهم‌کنش مسیرهای دوپامینرژیک و گرلین در گونه‌های مختلف جانوری است.

مسیرهای پیام‌رسانی انسولین و آندروژن‌ها احتمال دارد در افزایش بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS دخالت داشته باشند. هرچند که انسولین به طور عمده توسط سلول‌های نوع بتا بخش درون‌ریز غده پانکراس سنتز می‌شود ولی بخشی از آن در دستگاه عصبی مرکزی از جمله هسته پری‌ونتریکولار هیپوتالاموس سنتز می‌شود (۲۳). دوپامین از طریق گیرنده‌های D₂ اثرات مهاری بر ترشح انسولین اعمال می‌کند. به طوری که مطالعات پیشین نشان می‌دهند که هنگام حذف ژن گیرنده D₂ در دودمان سلولی INS-1 832/13 یا در موش‌های فاقد ژن گیرنده D₂ ترشح انسولین در مقایسه با موش‌های وحشی افزایش می‌یابد (۲۴). از طرفی نشان داده شده است که انسولین سبب مهار ترشح گرلین می‌گردد (۲۵). از این رو کاهش سنتز انسولین با تزریق دوپامین ممکن است یکی از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر ترشح گرلین باشد.

با توجه به این که آندروژن‌ها اثرات مهاری بر تولید گرلین اعمال می‌کنند (۱۴). همچنین ثابت شده است که دوپامین و آگونیست‌های دوپامینی سبب مهار سنتز آندروژن‌ها از طریق مهار محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی می‌شود (۲). بنابراین، کاهش آندروژن‌ها از طریق تزریق دوپامین می‌تواند یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد اثرات تحریکی دوپامین بر بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس باشد. از آنجا که تزریق داخل صفاقی ال‌دوپا با دوز ۱۰۰mg/kg یا

مسیرهای دوپامینرژیک در تنظیم جنبه‌های مختلف فعالیت محور تولیدمثلی و اثرات مهم آن بر روی کنترل میزان ترشح هورمون‌ها، نوروپپتیدها و آنزیم‌های دخیل در فرایند تولیدمثلی، در این تحقیق برای اولین بار در موش‌های صحرایی PCOS، اثرات تزریق داخل مغزی و داخل صفاقی دوپامین، ال‌دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین بر بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس و تخمدان بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که دوپامین و ال‌دوپا سبب کاهش بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس شد در حالی که آنها بیان ژن گرلین را در تخمدان از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش ندادند. نتایج حاصل از اثرات دوپامین بر افزایش بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس منطبق بر تحقیقات پیشین است که نشان دادند تزریق داخل مغزی دوپامین منجر به افزایش غلظت سرمی گرلین در موش‌های صحرایی نر می‌گردد (۱۰). همچنین مطالعه انجام شده در شرایط *in vitro* درباره اثرات دوپامین بر ترشح گرلین نشان داد که در سطح سلول‌های دودمان سلولی MGN3-1 تولیدکننده گرلین گیرنده‌های D₁ و D₂ دوپامینرژیک بیان شده و تزریق دوپامین به محیط کشت حاوی این سلول‌ها سبب تحریک ترشح گرلین می‌شود. در این دودمان سلولی نشان داده شد که تزریق آگونیست گیرنده D₁ دوپامینی به نام فنل‌دوپام سبب تحریک ترشح گرلین می‌شود و با تزریق آنتاگونیست این گیرنده به نام SKF3566 اثرات تحریکی دوپامین بر ترشح گرلین مهار می‌شود. در حالی که با تزریق آگونیست گیرنده‌های D₂ یا D₃ دوپامینرژیک نظیر برموکریپتین بر میزان ترشح گرلین اثری نداشت آنها با این یافته‌ها نشان دادند که اثرات دوپامین بر ترشح گرلین از طریق گیرنده نوع D₁ در این دودمان سلولی میانجیگری می‌شود (۱۸).

همچنین نشان داده شده است که تزریق نوروکسین دوپامینرژیک به نام ۶ هیدروکسی دوپامین به داخل ناحیه تگمنتال شکمی افزایش میزان دریافت غذای ناشی از تزریق گرلین را مهار می‌کند (۱۹). به علاوه ثابت شده است که

آماری به طور معنی‌داری کاهش یافت. تزریق داخل بطن سوم مغزی دوپامین یا ال‌دوپا سبب افزایش بیان ژن گرلین در هیپوتالاموس شد در حالی که تزریق داخل صفاقی دوپامین یا ال‌دوپا بیان ژن گرلین را در تخمدان از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش نداد. مسیر دوپامین‌ژیک می‌تواند است که اثرات خود بر کنترل بیان ژن گرلین در افراد PCOS را به طور عمده از طریق مسیرهای داخل هیپوتالاموسی تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاسگزار می‌کنند. تمام مراحل آزمایش با تایید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است. کد اخلاقی مطالعه حاضر IR.UMA.REC.1400.085 می‌باشد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

دوپامین با دوز ۵۰ mg/kg اثرات افزایشی معنی‌داری بر بیان نسبی ژن گرلین در تخمدان موش‌های صحرایی PCOS اعمال نکرد. در حالی که این دوز ال‌دوپا یا دوپامین قادر به کاهش معنی‌دار هورمون‌های LH و تستوسترون در موش‌های صحرایی PCOS بود (۱۲). محتمل است که مسیر دوپامین‌ژیک به طور عمده اثرات خود بر کنترل سنتز گرلین را از طریق مسیرهای داخل هیپوتالاموسی تحت تاثیر قرار دهد. با این وجود، برای تعیین دقیق‌تر اثرات مسیر دوپامین‌ژیک بر مسیر پیام‌رسانی گرلین در افراد سالم و PCOS، پیشنهاد می‌شود تحقیقات آتی اثرات تزریق مستقیم دوپامین یا ال‌دوپا به داخل تخمدان را با دوز استفاده شده در این تحقیق یا انتخاب مقادیر بالاتر بر بیان نسبی ژن گرلین در تخمدان بررسی کند.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین بیان نسبی ژن گرلین در هیپوتالاموس و تخمدان موش‌های صحرایی PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم از نظر

منابع

- 1.Sadeghi HM, Adeli I, Calina D, Docea AO, Mousavi T, Daniali M, et al. Polycystic ovary syndrome: A Comprehensive review of pathogenesis, management, and drug repurposing. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(2): 583.
2. Liu x, Herbison A. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology* 2013; 154(1): 340–50.
- 3.Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*. 2007; 30(5):194-202.
- 4.Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*. 1996; 35(11):1503-19.
- 5.Romero-Picó A, Novelle MG, Folgueira C, López M, Nogueiras R, Diéguez C. Central manipulation of dopamine receptors attenuates the orexigenic action of ghrelin. *Psychopharmacology*. 2013; 229(2): 275-83
- 6.Goshima Y, Masukawa D, Kasahara Y, Hashimoto T. L-DOPA and its receptor GPR143: implications for pathogenesis and therapy in parkinson's disease. *Front Pharmacol*. 2019; 10:1119.
7. Schalla MA, Stengel A. The role of the gastric hormones ghrelin and nesfatin-1 in reproduction. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(20): 11059.
8. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE., Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. 2003; 144: 1594–1602.

9. Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Heiman ML, Tschöp M, Pasquali R. Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: Correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:5625–29.
10. Sadeghzadeh A, Bayrami A, Mahmoudi F, Khazali H, Asadi A. The effects of interaction of dopaminergic and kisspeptin neural pathways on ghrelin secretion in rats. *J Paramed Sci.* 2018; 9(1):29-35.
11. Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, Simón C, et al. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(8): 2484-92.
12. Haghghat Gollo K, Mahmoudi F, Bayrami A, Zahri S. Influences of L-DOPA and blocking dopamine receptors on aromatase gene expression and serum concentration of LH in polycystic ovary syndrome model rats. *JABS.* 2020; 10(3):2448-55.
13. Lhosrobakhsh F, Moloudi MR, Shoja K, Mohammadi S. Effect of alpha- lipoic acid on pancreatic optic atrophy 1(OPA1) gene expression in male rat model of obstructive cholestasis and cirrhosis. *SJKU.* 2019; 24(5):120-34.
14. Khazali H, Mahmoudi F, Janahmadi M. Hypothalamic KiSS1/GPR54 gene expressions and luteinizing hormone plasma secretion in morphine treated male rats. *Int J Fertil Steril.* 2018; 12(3):223-8.
15. Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, Vicennati V, Manicardi E, Carcello A, et al. Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2003; 26(7): 629-34.
16. Akalu Y, Derbew Molla M, Dessie G, Ayelign B. Effect of ghrelin on body systems. *Int J Endocrinol.* 2020; 2020: 1385138.
17. Tang R, Ding X, Zhu J. Kisspeptin and polycystic ovary syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 298.
18. Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, et al. Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro. *Endocrinology.* 2011; 152(7): 2619-25.
19. Weinberg ZY, Nicholson ML, Currie. PJ. 6-Hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area suppress ghrelin's ability to elicit food-reinforced behavior. *Neurosci Lett.* 2011; 499(2): 70-3.
20. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(8):1772-85.
21. Romero-Picó A, Novelle MG, Folgueira C, López M, Nogueiras R, Diéguez C. Central manipulation of dopamine receptors attenuates the orexigenic action of ghrelin. *Psychopharmacology (Berl).* 2013; 229(2): 275-83.
22. Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict Biol.* 2007; 12(1): 6-16.
23. Blázquez E, Velázquez E, Hurtado-Carneiro V, Miguel Ruiz-Albusac J. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5: 161.
24. Ustione A, Piston DW, Harris PE. Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. *Mol Endocrinol.* 2013; 27(8): 1198-207.
25. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hökkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003; 52(10): 2546-53.