



## Long term malnutrition and mRNAs expression of RFRP-3 and KiSS-1 in hypothalamus of female ovariectomized rats

Maliheh Jahanara<sup>1</sup>, Amin Tamadon<sup>2,\*</sup>, Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi<sup>3</sup>, Farhad Rahmanifar<sup>4</sup>, Fatemeh Sabet Sarvestani<sup>1</sup>, Nader Tanideh<sup>5\*</sup>, Ali Moghadam<sup>6</sup>, Ali Niazi<sup>6</sup>

1. School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Infertility Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

3. Dept. of Animal Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

4. Dept. of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran

5. Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

6. Biotechnology Institute, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 7 May 2013

Accepted: 18 Sept 2013

### Abstract

**Introduction:** Arginine-phenylalanine-amide-related peptide-3 (RFRP-3) is an inhibitor of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion and an appetizer. Kisspeptin is a stimulator of GnRH and a regulator of energy metabolism. The objectives of the present study were to compare the effect of long term malnutrition on expression of RFRP-3 mRNA in dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and KiSS-1 mRNA in arcuate nucleus (ARC) of rat hypothalamus.

**Methods:** Sixteen female ovariectomized rats of the Sprague-Dawley strain were randomly allotted into three groups. After 2 weeks recovery period, one group was fed with perfect diet (rat standard feed) and the other group was fed with the half dietary of perfect diet for 14 days. The control group (n=4) were sacrificed 2 weeks after surgery (day 0). Relative expression of RFRP-3 and KiSS-1 mRNAs (compared to the control group) were measured using real-time PCR method in DMH and ARC of hypothalamus, respectively.

**Results:** Mean and SE of relative expression of RFRP-3 mRNA in DMH in the half dietary rats was higher than that of the perfect diet ones (P=0.01). Relative expression of KiSS-1 mRNA in ARC was not different between two groups of rats (P=0.1).

**Conclusion:** Long term malnutrition (2 weeks) increased RFRP-3 mRNA expression in DMH of rats hypothalamus, but had no effect on KiSS-1 mRNA expression in the ARC nucleus of ovariectomized female rats.

**Key words:** Malnutrition, RFRP-3 mRNA, KiSS-1 mRNA, Hypothalamus, Rat

\* Corresponding authors e-mail: tamadon@shirazu.ac.ir  
nadertanideh@yahoo.com

Available online at: [www.phypha.ir/ppj](http://www.phypha.ir/ppj)

## سوء تغذیه طولانی مدت و میزان بیان mRNA های RFRP-3 و KiSS-1 در هیپوتالاموس موش های صحرائی ماده تخمدان برداری شده

ملیحه جهان آرا<sup>۱</sup>، امین تمدن<sup>۲\*</sup>، محمدرضا جعفرزاده شیرازی<sup>۳</sup>، فرهاد رحمانی فر<sup>۴</sup>، فاطمه ثابت سروسستانی<sup>۱</sup>، نادر تنیده<sup>۵</sup>، علی مقدم<sup>۶</sup>، علی نیازی<sup>۶</sup>

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز
۲. مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز
۳. بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز
۴. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز
۵. مرکز تحقیقات سلول های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز
۶. پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز

پذیرش: ۲۷ شهریور ۹۲

دریافت: ۱۷ اردیبهشت ۹۲

### چکیده

**مقدمه:** پیتید وابسته به آرژنین - فنیل آلانین - آمید ۳- (RFRP-3) مهارکننده هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) و عاملی اشتهاآور است. کیس پیتین محرک GnRH و کنترل کننده متابولیسم انرژی می باشد. هدف پژوهش کنونی مقایسه اثر سوء تغذیه طولانی مدت بر بیان RFRP-3 mRNA در هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) و KiSS-1 mRNA در هسته کماتی (ARC) هیپوتالاموس موش صحرائی بود.

**روش ها:** شانزده موش صحرائی ماده تخمدان برداری شده سویه اسپراگ - داولی به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. در دو گروه جیره غذایی (n=۶) پس از طی دوره بهبودی دو هفته ای، یک گروه با جیره کامل (خوراک استاندارد موش صحرائی) و گروه دوم با جیره نصف جیره کامل، ۱۴ روز تغذیه شدند. گروه شاهد (n=۴) دو هفته پس از عمل جراحی (روز صفر) به روش اخلاقی کشته شدند. با استفاده از روش real-time PCR بیان نسبی mRNA های RFRP-3 و KiSS-1 (نسبت به گروه شاهد) به ترتیب در DMH و ARC هیپوتالاموس در دو گروه موش های صحرائی مقایسه شد.

**یافته ها:** میانگین و انحراف معیار بیان نسبی RFRP-3 mRNA در DMH در موش های صحرائی با جیره نصف بیشتر از جیره کامل بود (P=۰/۰۱). بیان نسبی KiSS-1 mRNA در ARC بین دو گروه موش صحرائی تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۱).

**نتیجه گیری:** سوء تغذیه طولانی مدت (۲ هفته) سبب افزایش بیان RFRP-3 mRNA در DMH هیپوتالاموس موش های صحرائی شد ولی بر بیان KiSS-1 mRNA در هسته ARC تاثیری نداشت.

**واژه های کلیدی:** سوء تغذیه، RFRP-3 mRNA، KiSS-1 mRNA، هیپوتالاموس، موش صحرائی

### مقدمه

در شرایط استرس متابولیکی قرار می گیرند، برای تأمین انرژی مورد نیاز، بقای خود را به تولیدمثل ترجیح می دهند [۴۱]. علاوه بر این دستگاه تولیدمثل به تغییرات انرژی حساس است [۴۱]. با این حال هنوز مسیر ارتباطی بین موازنه انرژی و تولیدمثل به خوبی شناخته نشده است. زمانی که جیره غذایی برای واکنش های متابولیکی کافی نیست، تخمکریزی و

زمانی که دسترسی به غذا برای حیوانات محدود می شود و

tamadon@shirazu.ac.ir

\* نویسندگان مسئول مکاتبات:

nadertanideh@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

و موش قرار دارند [۵، ۲۱]. در موش صحرایی [۹] و میش [۳۲] RFRP-3 سبب مهار ترشح گونادوتروپین می‌شود. تزریق داخل بطن مغزی و تزریق عمومی RFRP نیز ترشح هورمون لوتئینی کننده در همستر را مهار کرد [۲۱]. نشان داده شده است که GnIH رفتار اشتها را در مرغ تحریک می‌کند [۳۶]. همچنین پژوهش‌های دیگر در پرندگان و پستانداران نقش اشتها آور GnIH را نشان داده‌اند [۸، ۱۰، ۱۴، ۳۶]. بنابراین هدف پژوهش کنونی، بررسی تأثیر سوء تغذیه طولانی مدت بر بیان KiSS-1 mRNA در هسته ARC و بیان RFRP-3 mRNA در هسته DMH هیپوتالاموس موش صحرایی بود.

## مواد و روش‌ها

شانزده موش صحرایی ماده بالغ سویه اسپراگ-داولی ( $20 \pm 20$  گرم) در قفس‌های انفرادی در اتاقی با دمای  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  و رطوبت  $50 \pm 5$  درصد و تهویه ۱۲ بار در ساعت و در ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. خوراک استاندارد موش صحرایی (تا پیش از شروع پژوهش) و آب به طور آزاد در دسترس آنها قرار داده شد. پژوهش بر اساس دستورالعمل مصوب اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. برای حذف اثرات هورمون‌های چرخه فحلی همه موش‌های صحرایی تخمدان‌برداری شدند. موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی کنامین (۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم، آلفازین، ووردن، هلند) و زایلازین (۸ میلی‌گرم به کیلوگرم، آلفازین، ووردن، هلند) بیهوش شده و با روش آسپتیک برشی در زیر ناف بطول ۳ سانتیمتر در ناحیه خط میانی بدن ایجاد شد و پس از نمایان شدن تخمدان، با کنترل خونریزی، موش‌های صحرایی، تخمدان‌برداری شدند.

جیره استاندارد موش‌های صحرایی دارای ۹۰٪ ماده خشک، ۸٪ خاکستر، ۴/۱٪ چربی خام، ۲۱/۶٪ پروتئین خام، ۷۰/۸٪ ماده مغذی قابل گوارش (TDN)، ۰/۴٪ کلسیم، ۰/۳۵٪ پتاسیم و ۰/۱٪ سدیم بود که بر اساس روش AOAC, 1995 اندازه‌گیری شد. دوازده موش صحرایی دو هفته بعد از جراحی به صورت تصادفی به دو گروه مساوی با

چرخه فحلی متوقف می‌شوند [۱۶، ۳۷]. محدود کردن غذا در خوک باعث اثر منفی بر پالس‌های هورمون لوتئینی کننده (LH) در زمان بلوغ [۲] و در انسان سبب کاهش گونادوتروپین‌ها [۴۰] و کاهش رشد فولیکول‌ها [۲۸] می‌شود. هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) و ترشح گونادوتروپین‌ها با محدود کردن جیره غذایی مهار می‌شوند به طوری که میزان ترشح آنها ممکن است برای فرایند فولیکولوژنیز کافی نباشد [۳، ۴]. از این رو شناخت بهتر مسیرهای ارتباطی موازنه انرژی و تولیدمثل راهگشای تدوین راهکارهایی برای حفظ سلامت تولیدمثل خواهد بود.

کیس‌پتین جزئی از خانواده پپتیدهایی است که به وسیله ژن KiSS-1 بیان می‌شوند و گیرنده آن نیز GPR45 می‌باشد که علاوه بر تنظیم آزادسازی GnRH [۱۵] و LH [۱۱، ۲۴] در بیشتر گونه‌ها، از جمله کاندیداهای ارتباط بین موازنه انرژی و تولیدمثل است [۶، ۲۶]. چند پژوهش نقش KiSS-1، کیس‌پتین و GPR54 را به عنوان دروازه‌بان‌های نورون‌های GnRH و موثر در کنترل متابولیسی تولیدمثل پیشنهاد کرده‌اند [۱۳، ۳۴]. نورون‌های کیس‌پتین در هسته‌های کمائی (ARC) و پیرابنسی جلویی-شکمی (AVPV) قرار دارند [۱۲، ۳۳]. گرسنگی و شیردهی سبب کاهش KiSS-1 و GPR54 می‌شود [۲۳]. نوروپپتید Y (NPY) نوروپپتیدی اشتهاآور است که در هسته ARC بیان می‌شود [۱۶] که در تنظیم محور تولیدمثلی با واسطه تنظیم بیان KiSS-1 نقش ایفا کند [۷، ۲۳]. از سوی دیگر پپتید وابسته به آگوتی (AgRP) نیز یک پپتید اشتهاآور است [۳۵] که نورون‌های بیان کننده آن نیز در ARC گوسفند قرار دارند و با نورون‌های کیس‌پتین در ارتباط است [۱]. رسپتورهای لپتین نیز که در تغذیه و تولیدمثل نقش دارند با نورون‌های کیس‌پتین ارتباط دارند [۳۰]. همچنین تزریق کیس‌پتین سبب افزایش انسولین [۴۳] و ادیوکین [۴۲] در میمون نر بالغ شده است.

هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) در پرندگان و یا هومولوگ آن در پستانداران، پپتید وابسته به RFamide (RFRP) از خانواده پپتیدهای آر-اف آمید (آرژنین - فنیل آلانین) است که برخلاف کیس‌پتین مهار کننده ترشح گونادوتروپین‌ها می‌باشند [۳۹]. نورون‌های GnIH در هسته پشتی - میانی (DMH) هیپوتالاموس همستر، موش صحرایی

دقیقه در دمای اتاق زیر هود قرار گرفت. RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر X ۰/۵ که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود الکتروفورز شد. کمیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر (نانودراپ تکنولوژی، ویلمینگتون، آمریکا) اندازه گیری شد. سپس کیفیت RNA با ران کردن روی ژل آگارز بررسی شد. بعد از انجام نانودراپ RNA با توجه به روش موجود در کیت DNase (فرمتاز، آلمان) تیمار انجام شد. ۱/۱ میکرولیتر total RNA و ۵ میکرولیتر آب DEPC و ۲ میکرولیتر آنزیم DNase و ۲ میکرولیتر بافر DNase باهم مخلوط شده و با آب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس به میکروتیوب حاوی مواد مورد نظر ۲ میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ mM اضافه و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شد.

در اینجا تیمار DNase به پایان رسید، در این مرحله کیفیت و کمیت RNA به وسیله نانودراپ اندازه گیری شد و برای اطمینان از کیفیت روی ژل آگارز ۱٪ در بافر X ۰/۵ برده شد. سپس نمونه های استخراج شده در دمای ۸۰°C -نگهداری شد. رشته اول cDNA با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت فرمتاز (First Strand cDNA Synthesis Kit) سنتز شد. ابتدا ۱۱ میکرولیتر total RNA و ۱ میکرولیتر Oligo dT (۱۰ μM) بر روی یخ به یک میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس ۴ میکرولیتر بافر RNase inhibitor (۱۰ mM) و ۱ میکرولیتر آنزیم Mulv و ۱ میکرولیتر آب DEPC به آنها افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲°C و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. پرایمرها با نرم افزار Allele ID 7 (Premier Biosoft International، آمریکا) برای ژن مرجع KiSS-1 (NM\_181692) و RFRP-3 (NM\_023952) طراحی شدند. ژن گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) در موش صحرایی (M32599) به عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده ها استفاده شد (جدول ۱).

میکروتیوب حاوی رشته اول cDNA در دمای ۲۰°C -نگهداری شد. رشته اول cDNA سنتز شده بر روی ژل آگارز

جیره کامل (۱۵ گرم/کیلوگرم) خوراک استاندارد موش صحرایی (n=۶) و گروه دیگر با جیره نصف (۷/۵ گرم/کیلوگرم) گروه قبلی (n=۶) به مدت ۱۴ روز تغذیه شدند و پس از بیهوشی با اتر به روش اخلاقی کشته شدند. چهار موش گروه شاهد نیز دو هفته پس از عمل جراحی (روز صفر) به روش اخلاقی کشته شدند. پس از خارج کردن مغز از جمجمه و برداشتن قشر مخ، داینسفالون خارج شد و به شیوه کرونال برشی در جلوی ناحیه اپتیک کپاسما و برش بعدی پشت اجسام پستانی بر اساس اطلس مغز موش صحرایی [۲۵] انجام شد. برای جدا کردن ARC از AVPV برش سوم در وسط اپتیک تراکت و دقیقاً جلوی اینفاندیبولوم انجام شد [۲۹]. ناحیه شامل هسته ARC و DMH در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس به فریزر ۸۰°C -منتقل شد.

تمام RNA با استفاده از بافر RNX- Plus (سیناژن، ایران) استخراج شد. به طور خلاصه حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت در ازت مایع پودر شد. سپس پودر بافت به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و به آن ۱ میلی لیتر بافر RNX- Plus اضافه شد. بعد از آن ۵ تا ۱۰ ثانیه میکروتیوب ورتکس شد تا بافت به طور کامل هموژنیزه شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم به میکروتیوب حاوی بافت هموژنیزه شده اضافه شده و به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه به آرامی مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. بعد از اتمام سانتریفوژ، مایع رویی به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید انتقال داده شد و به میزان هم حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده و به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند. پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً خالی شد. به میزان ۱ میلی -لیتر از اتانول ۷۵ درجه به نمونه ها اضافه و به آرامی تکان داده شد و سپس ورتکس شد. بعد از ورتکس، به مدت ۸ دقیقه با سرعت rpm ۷۵۰۰ در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً خالی شد و برای خشک شدن زیر هود قرار گرفت. بعد از خشک شدن به میکروتیوب حاوی نمونه، ۳۵ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و به مدت ۵ تا ۱۰

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های KiSS-1، RFRP-3 و GAPDH در موش صحرایی

آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)
KiSS-1-F	5` TGCTGCTTCTCCTCTGTG 3`	۱۱۶
KiSS-1-R	5` CCAGGCATTAACGAGTTCC 3`	
RFRP-3-F	5` CTCAGCAGCCAACCTTCC 3`	۱۶۵
RFRP-3-R	5` AAACCAGCCAGTGTCTTG 3`	
GAPDH-F	5` AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC 3`	۱۱۲
GAPDH-R	5` CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG 3`	

دست آمد.

(CT GAPDH) OVX- (CT KiSS-1 - CT GAPDH)

DIET - $\Delta\Delta Ct$  = (CT KiSS-1)

(CT GAPDH) OVX- (CT RFRP-3 - CT GAPDH)

DIET - $\Delta\Delta Ct$  = (CT RFRP-3)

OVX: گروه شاهد و DIET: هر کدام از دو گروه تغذیه.

نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - سمیرنوف ارزیابی شد. برای نرمال کردن داده‌ها به روش ترانسفورماسیون، جذر دوم داده‌ها محاسبه شد. سپس مقایسه میانگین بیان نسبی mRNAهای KiSS-1 و RFRP-3 در دو گروه موش‌های صحرایی جیره کامل و نصف جیره کامل با آزمون t مستقل انجام شد (نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵).  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

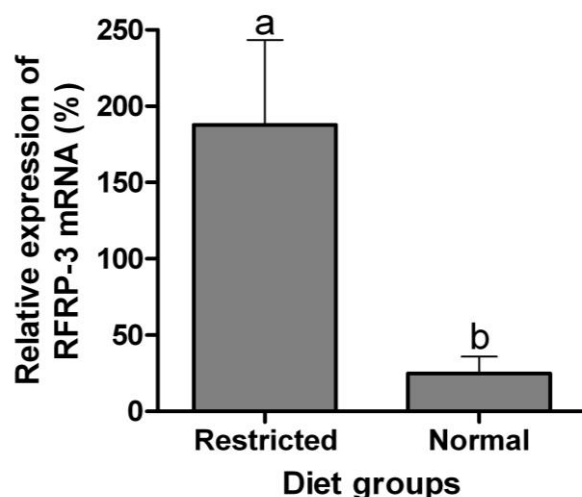
بیان نسبی mRNA RFRP-3 در هسته DMH در موش‌های صحرایی با جیره کامل کمتر از موش‌های صحرایی بود که ۱۴ روز نصف جیره متداول را دریافت کرده بودند ( $P=0.01$ ، شکل ۱). سوء تغذیه طولانی مدت (۱۴ روز)، میانگین بیان mRNA RFRP-3 را بیش از ۷/۵ برابر در موش‌های صحرایی افزایش داد. بیان نسبی mRNA KiSS-1 در هسته ARC بین موش‌های صحرایی با جیره کامل و جیره نصف تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P=0.01$ ، شکل ۲).

۱٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و از کیفیت مطلوب آن که یک اسمیر از زیر چاهک به پایین ژل است، اطمینان حاصل شد. در حین سنتز cDNA نمونه‌ای نیز به عنوان شاهد منفی گذاشته شد به طوری که در این نمونه آنزیم Mulv اضافه نشد تا آلودگی ژنومی مشخص شود. با استفاده از cDNA استخراج شده به عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اجرا شد. قطعه cDNA تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز ژل آغاز ۱٪ بررسی شد. مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱ میکرولیتر پرایمر Forward ( $10 \mu M$ )، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse ( $10 \mu M$ )، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ( $10 mM$ )، ۲ میکرولیتر بافر  $10 \times$ ، ۰/۷ میکرولیتر  $MgCl_2$  ( $50 mM$ )، ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase و ۱۳/۶ میکرولیتر آب DEPC بود. چرخه حرارتی واکنش شامل ۲ دقیقه در  $94^\circ C$  و ۴۰ سیکل آن در  $94^\circ C$  برای ۱۰ ثانیه،  $57^\circ C$  برای ۱۵ ثانیه و  $72^\circ C$  برای ۳۰ ثانیه است. بعد از ۴۰ سیکل نتایج این سیکل از  $95^\circ C$  تا  $50^\circ C$  ذوب شد.

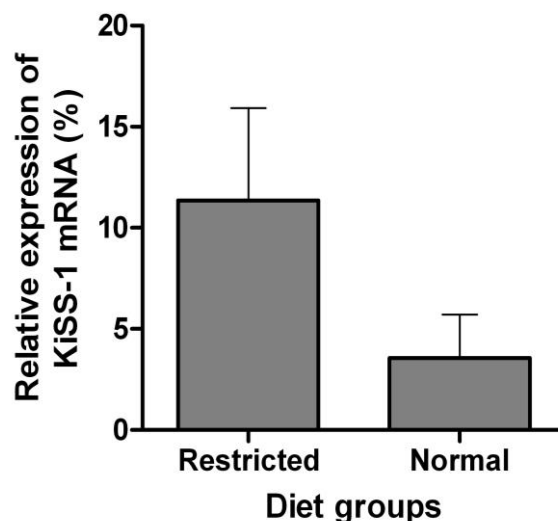
به وسیله اطلاعات کمی real-time PCR، بیان نسبی KiSS1 و RFRP-3 بر اساس روش سیکل آستانه‌ای (CT)، محاسبه شد. CT هر نمونه برای ژن اصلی و شاهد داخلی با استفاده از نرم افزار Line-gene K محاسبه شد. بیان mRNAهای هدف بیش از مقادیر مرجع بود که توسط معادله  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. در آن  $\Delta CT$  با تفریق مقدار مربوط به CT GAPDH (شاهد داخلی) از CT مربوط به نمونه اصلی (KiSS-1 یا RFRP-3) محاسبه شد.  $\Delta\Delta CT$  با کم کردن  $\Delta CT$  هر نمونه از میانگین  $\Delta CT$  گروه شاهد با فرمول زیر به

پژوهش، کاهش مصرف غذا در مرغ، سبب افزایش بیان GnIH می‌شود [۸]. همچنین تزریق داخل بطن مغزی GnIH در مرغ سبب افزایش مصرف خوراک شد [۳۶]. احتمالاً GnIH در گوسفند نیز در تنظیم مصرف غذا موثر است چون آکسون‌های GnIH به ARC و دیگر مناطقی می‌روند که در تنظیم اشتها موثر هستند [۲۷، ۳۱]. تزریق درون بطن مغزی GnIH در موش، گوسفند و میمون سبب افزایش اشتها شد [۱۰]. تزریق GnIH درون بطن مغز اردک سفید سبب مهار ترشح LH و افزایش بیان فاس در نورون‌های GnIH شد [۱۴]. همچنین گرسنگی کوتاه مدت (۴۸ ساعت) در اردک سفید سبب مهار ترشح LH و افزایش بیان فاس در نیمی از نورون‌های GnIH شد [۱۴]. در همستر ماده سوء تغذیه طولانی مدت (۸ و ۱۲ روزه) میزان نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته DMH افزایش داد [۲۰]. از سوی دیگر گرسنگی محرک ترشح هورمون رشد است [۴۴] و نشان داده شده است که GnIH در موش صحرائی سبب تحریک ترشح هورمون رشد می‌شود [۱۸]. همچنین در زمان استرس نیز میزان بیان GnIH در پرندگان [۵] و موش صحرائی [۱۹] زیاد می‌شود. نتایج این پژوهش به همراه پژوهش‌های قبلی نشانگر نقش RFRP-3 در ارتباط بین موازنه انرژی و تولیدمثل می‌باشد.

هرچند نتایج این پژوهش اختلاف معنی‌داری در بیان KiSS-1 mRNA در اثر ایجاد سوء تغذیه طولانی مدت در موش صحرائی نشان نداد؛ اما در پژوهشی دیگر گرسنگی کوتاه مدت (۷۲ ساعت) در مرحله بلوغ سبب کاهش KiSS-1 mRNA و کاهش LH در موش‌های صحرائی نر و ماده شد [۱۳]. همچنین در پژوهشی دیگر در موش صحرائی ماده، کاهش ۲۴ ساعته جیره غذایی سبب کاهش بیان کیس‌پپتین و مهار محور تولیدمثلی شد [۱۷]. ایجاد گرسنگی و سیری متناوب در طول سه ماه در موش صحرائی ماده نیز سبب کاهش بیان نورون‌های کیس‌پپتین و بیان KiSS-1 mRNA در ARC و در چهار مرحله چرخه تولیدمثلی شد [۲۲]. همچنین کاهش لپتین خون سبب کاهش KiSS-1 mRNA و LH در طول موازنه منفی انرژی شد [۳۸]. گیرنده‌های لپتین با کیس‌پپتین و NPY در ARC به طور هم زمان بیان می‌شوند و تجویز لپتین سبب کاهش NPY و افزایش بیان



شکل ۱- میانگین و خطای استاندارد میزان بیان نسبی mRNA RFRP-3 در هسته پستی - داخلی هیپوتالاموس (DMH) موش‌های صحرائی با جیره کامل (normal) و نصف جیره کامل (restricted) حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار می‌باشد. (n=۶ و P=۰/۰۱).



شکل ۲- میانگین و خطای استاندارد میزان بیان نسبی KiSS-1 mRNA در هسته کمانی (ARC) هیپوتالاموس موش‌های صحرائی با جیره کامل (normal) و نصف جیره کامل (restricted) (n=۶).

## بحث

نتایج پژوهش کنونی نشان داد که سوء تغذیه طولانی مدت سبب افزایش بیان RFRP-3 mRNA در هسته DMH هیپوتالاموس موش صحرائی می‌شود. مشابه نتایج این

شاید کیس‌پپتین نقش مهمی در این رابطه نداشته باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند. هزینه‌های این پژوهش از محل بودجه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز و مدیریت امور علمی دانشگاه شیراز تأمین شد.

کیس‌پپتین شد [۱۶]. مقایسه پژوهش‌های دیگر با این پژوهش نشان می‌دهد که کاهش طولانی مدت و مداوم جیره احتمالاً با ایجاد تطابق در موش صحرایی تأثیری در بیان کیس‌پپتین در موش صحرایی ماده تخمدان برداری شده نداشت.

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش کنونی به نظر می‌رسد که سوء تغذیه طولانی مدت (۲ هفته) احتمالاً از طریق افزایش بیان RFRP-3 mRNA در هسته DMH هیپوتالاموس می‌تواند ترشح گونادوتروپین‌ها را مهار کند. از سوی دیگر با توجه به عدم تغییر بیان KiSS-1 mRNA در هسته ARC

## References

- [1] Adam CL, Archer ZA, Findlay PA, Thomas L, Marie M, Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine-and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology* 75 (2002) 250-256.
- [2] Booth PJ, Cosgrove JR, Foxcroft GR, Endocrine and metabolic responses to realimentation in feed-restricted prepubertal gilts: associations among gonadotropins, metabolic hormones, glucose, and uteroovarian development. *J Anim Sci* 74 (1996) 840-848.
- [3] Brito LFC, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH, Boisclair YR, Ehrhardt RA, Kastelic JP, Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction* 134 (2007) 171-181.
- [4] Brito LFC, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews Jr DH, Mir PS, Kastelic JP, Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. *Domest Anim Endocrinol* 33 (2007) 1-18.
- [5] Calisi RM, Rizzo NO, Bentley GE, Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 157 (2008) 283-287.
- [6] Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146 (2005) 3917-3925.
- [7] Castellano JM, Roa J, Luque RM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M, KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* 30 (2009) 139-145.
- [8] Chowdhury VS, Tomonaga S, Nishimura S, Tabata S, Cockrem JF, Tsutsui K, Furuse M, Hypothalamic gonadotropin-inhibitory hormone precursor mRNA is increased during depressed food intake in heat-exposed chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162 (2012) 227-233.
- [9] Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30 (2009) 371-378.
- [10] Clarke IJ, Smith JT, Henry BA, Oldfield BJ, Stefanidis A, Millar RP, Sari IP, Chng K, Fabre-Nys C, Caraty A, Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding. *Neuroendocrinology* 95 (2012) 305-316.
- [11] Dhillon W, Murphy K, Bloom S, The neuroendocrine

- physiology of kisspeptin in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 8 (2007) 41-46.
- [12] Dorling AA, Todman MG, Korach KS, Herbison AE, Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology* 78 (2003) 204-209.
- [13] Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M, Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 254 (2006) 127-132.
- [14] Fraley GS, Coombs E, Gerometta E, Colton S, Sharp PJ, Li Q, Clarke IJ, Distribution and sequence of Gonadotropin-inhibitory hormone and its potential role as a molecular link between feeding and reproductive systems in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*). *Gen Comp Endocrinol* 184 (2013) 103-110.
- [15] Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA, A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145 (2004) 4073-4077.
- [16] Hill JW, Elmquist JK, Elias CF, Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 (2008) E827-E832.
- [17] Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Fujisawa S, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M, Sensitivities of mRNA expression levels of Kiss1 and its receptor, Kiss1r, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *J Endocrinol* 207 (2010) 195-202.
- [18] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51 (2007) 171-180.
- [19] Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufner D, Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci* 106 (2009) 11324-11329.
- [20] Klingerman CM, Williams Iii WP, Simberlund J, Brahme N, Prasad A, Schneider JE, Kriegsfeld LJ, Food restriction-induced changes in gonadotropin-inhibiting hormone cells are associated with changes in sexual motivation and food hoarding, but not sexual performance and food intake. *Front Endocrinol* 2 (2011) 1-15.
- [21] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 2410-2415.
- [22] Kumar S, Kaur G, Intermittent fasting dietary restriction regimen negatively influences reproduction in young rats: a study of hypothalamo-hypophysial-gonadal axis. *PLoS ONE* 8 (2013) 1-15.
- [23] Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M, Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 148 (2007) 4601-4611.
- [24] Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T, Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2004) 383-388.
- [25] Paxinos G, Watson C, editors. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. New York: Academic Press, 2007.
- [26] Pillon D, Caraty A, Fabre-Nys C, Bruneau G, Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 749-753.
- [27] Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ, Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 690-697.
- [28] Quesnel H, Pasquier A, Mounier AM, Prunier A, Influence of feed restriction during lactation on gonadotropic hormones and ovarian development in primiparous sows. *J Anim Sci* 76 (1998) 856-863.
- [29] Salehi MS, Namavar MR, Jafarzadeh Shirazi MR, Rahmanifar F, Tamadon A, A simple method for isolation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei in the rat hypothalamus. (2013) *Anatomy* in press.
- [30] 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.
- [31] Smith JT, Clarke IJ, Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab* 21



- (2010) 255-260.
- [32] Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN, Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149 (2008) 5770-5782.
- [33] Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA, Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146 (2005) 3686.
- [34] Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ, Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149 (2008) 1951-1959.
- [35] Stutz AM, Morrison CD, Argyropoulos G, The Agouti-related protein and its role in energy homeostasis. *Peptides* 26 (2005) 1771-1781.
- [36] Tachibana T, Sato M, Takahashi H, Ukena K, Tsutsui K, Furuse M, Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Res* 1050 (2005) 94-100.
- [37] Tropp J, Markus EJ, Effects of mild food deprivation on the estrous cycle of rats. *Physiol Behav* 73 (2001) 553-559.
- [38] True C, Kirigiti MA, Kievit P, Grove KL, Smith MS, Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinizing hormone restoration during exit from negative energy balance. *J Neuroendocrinol* 23 (2011) 1099-1112.
- [39] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 661-667.
- [40] Veldhuis JD, Iranmanesh A, Evans WS, Lizarralde G, Thorner MO, Vance ML, Amplitude suppression of the pulsatile mode of immunoradiometric luteinizing hormone release in fasting-induced hypoandrogenemia in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 76 (1993) 587-593.
- [41] Wade GN, Jones JE, Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287 (2004) R1277-R1296.
- [42] Wahab F, Bano R, Jabeen S, Irfan S, Shahab M, Effect of peripheral kisspeptin administration on adiponectin, leptin, and resistin secretion under fed and fasting conditions in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Horm Metab Res* 42 (2010) 570-574.
- [43] Wahab F, Riaz T, Shahab M, Study on the effect of peripheral kisspeptin administration on basal and glucose-induced insulin secretion under fed and fasting conditions in the adult male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Horm Metab Res* 43 (2010) 37-42.
- [44] Widmaier EP, Raff H, Strang KT, editors. *Vander's human physiology*. 11th ed.: McGraw-Hill Higher Education, 2006.