Physiology and Pharmacology, 16 (1), 70-78
Spring 2012 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of ICV injection of ghrelin and leptin on T_3 and T_4 plasma levels in Rat

Ommolbanin Amoo-Rajabi[1], Ali Moghimi[2], Homayoon Khazali[3]

1. Dept. Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Applied Research Center for Neurofeedback and Neurobehavioral Sciences (Aren), Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Dept. Biology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 26 Sep 2011 **Accepted: 22 Feb 2011**

Abstract

Introduction: Ghrelin, increases food intake, decreases T_3 and T_4 concentrations and stimulates insulin release, while leptin reduces food intake and suppresses appetite. Considering the importance of thyroid hormones, ghrelin and leptin in body metabolism, the purpose of this study was to investigate the effect of interactions between ghrelin and leptin (injected via ICV route) and plasma T_3 and T_4 concentrations in rats.

Methods: Fifty-six Wistar male rats (230 to 250 g/BW) were randomly divided into 7 groups. Groups 1, 2 and 3 received 1, 3 and 5 nmol ghrelin, while groups 4, 5 and 6 received 1, 5, 10 nmol leptin (2 µl via lateral cerebral ventricle). Animals in the 7th group received 5 nmol ghrelin with 10 nmol leptin via the same route for 3 days. Blood samples were collected daily starting from one day before until one day after infusions and plasma samples were used to assess T3 and T4 concentrations by RIA. To ensure proper cannulation, perfusion and brain slices were performed.

Results: The results indicated that ghrelin significantly decreased T_3 and T_4 concentrations, whereas leptin increased these concentrations. The simultaneous injection of ghrelin and leptin significantly reduced the inhibitory effect of ghrelin on thyroid hormones concentrations.

Conclusion: According to the results and other researchers' suggestions, the opposite effects of leptin and ghrelin could be emphasized and some hormonal mechanisms for these 2 hormones (transmitters) such as HPA and/or HPT axes or MSH systems could be suggested.

Key words: Ghrelin, leptin, T_3, T_4, ICV injection

* Corresponding author e-mail: rbani1359@gmail.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۶ (۱)، ۷۰ – ۷۸
بهار ۱۳۹۱

بررسی اثر تزریق داخل بطن مغزی گرلین و لپتین بر غلظت هورمونهای تیروئیدی (T_3 و T_4) در موش صحرایی

ام البنین عمورجبی[۱]، علی مقیمی[۲]، همایون خزعلی[۳]
۱. گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲. مرکز پژوهش‌های کاربردی نوروفیدبک، علوم اعصاب و رفتار (آرن)، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

دریافت: ۴ مهر ۹۰ پذیرش: ۳ اسفند ۹۰

چکیده

مقدمه: گرلین باعث افزایش جذب غذا، کاهش غلظت هورمونهای تیروئیدی و تحریک آزادی انسولین و لپتین باعث کاهش جذب غذا و مهار اشتها می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر برهم کنش گرلین و لپتین (تزریق داخل بطنی مغز) بر غلظت هورمونهای تیروئیدی در رت می‌باشد.

روش ها: ۵۶ رت نر ویستار (۲۵۰–۲۳۰ گرم) به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند. گروههای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱، ۳ و ۵ نانومول گرلین، گروههای ۴، ۵ و ۶ به ترتیب ۱، ۵ و ۱۰ نانو مول لپتین از طریق بطن جانبی مغز و گروه هفتم، ۵ نانو مول گرلین و ۱۰ نانو مول لپتین به مدت ۳ روز بطریق بطن جانبی مغز (۲ میکرو لیتر) دریافت نمودند. نمونه های خونی از یک روز قبل تا ۱ روز بعد از آخرین تزریق بمدت ۵ روز جمع آوری و غلظت T_3 و T_4 پلاسمای خون به روش RIA اندازه گیری شد. جهت اطمینان از صحت کانول گذاری، برش گیری از مغز صورت گرفت.

یافته ها: گرلین موجب کاهش معنی دار T_3 و T_4 به ترتیب به میزان ۳۸٪ و ۴۲/۹٪ و لپتین موجب افزایش معنی دار هورمون‌های مذکور می‌گردد. نتایج ناشی از تزریق همزمان این دو ماده نشان داد که لپتین اثر گرلین بر کاهش T_3 و T_4 را بازداری نموده است.

نتیجه گیری: می‌توان تاکید نمود که گرلین و لپتین به عنوان دو پپتید با اثرات متضاد بوده بطوریکه لپتین اثر مهاری گرلین بر T_3 و T_4 را به طور معنی داری بازداری می‌کند. مسیر های هورمونی همچون هسته های هیپوتالاموسی و نقش MSH پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گرلین، لپتین، T_3، T_4، تزریق ICV

مقدمه

متابولیسم و فرایند جذب و مصرف انرژی در پستانداران از طریق فاکتورهای متعدد عصبی، هورمونی و محیطی به طور دقیقی تنظیم می‌شود. هورمون‌های تیرویدی مهم‌ترین و بیشترین نقش را در تنظیم متابولیسم پایه بدن بر عهده دارند [۱۲]. لازم به ذکر است که فاکتورهای متعددی بر میزان هورمون‌های تیروئیدی تأثیر دارند که از بین آنها می‌توان به گرلین اشاره کرد.

گرلین برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ توسط Kojima و همکارانش از معده Rat جداسازی شد و به عنوان لیگاند درونی برای گیرنده GHS-Ra مطرح گردید. گرلین به هنگام گرسنگی به مقدار زیادی در سلولهای X/A like cell غدد

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: rbani1359@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

مخاط معده و به مقدار اندکی در سایر اندام‌ها از جمله مغز، هیپوفیز، سلولهای لایدیگ و سلولهای سرتولی نیز به نسبت کمتر تولید می‌شود [۴]. مطالعات نشان داده گرلین علاوه بر افزایش هورمون رشد [۱۱،۲۶] سبب افزایش تخلیه معده، افزایش اشتها، افزایش وزن بدن [۳، ۱۷]، تحریک ترشح ACTH، مهار LH [۶] و کاهش غلظت هورمون‌های تیروئیدی می‌شود [۱، ۵، ۱۶، ۳۱، ۳۲، ۳۳].

تزریق گرلین از طریق افزایش بیان ژن‌های AgRP و NPY در هستهٔ ARC هیپوتالاموس که نورونهای آنها مستقیماً بر روی TRH گیرنده دارند سبب کاهش هورمونهای تیرویدی می‌شوند. لپتین (از کلمهٔ یونانی leptos به معنای لاغر) یک هورمون پروتئینی است. ژن لپتین اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط Zhang کلون شد [۲]. لپتین بطور عمده از بافت چربی سفید و به میزان کمتر از سلولهای اپیتلیال معده و جفت نیز ترشح می‌شود. لپتین باعث کاهش جذب غذا، افزایش مصرف انرژی و در نتیجه مهار اشتها خواهد شد و این کار را از طریق مهار سنتز NPY انجام می‌دهد. مطالعات اخیر نشان داده که باعث افزایش میزان ترشح هورمونهای تولید مثلی (FSH, LH, GnRH) و هورمونهای تیروئیدی می‌شود. لپتین از طریق مهار مسیر AgRP/NPY و تحریک محور H-P-T و تحریک α-MSH فعالیت محور تیرویدی را افزایش داده و سبب افزایش میزان ترشح T_3 و T_4 پلاسما می‌گردد و متابولیسم افزایش می‌یابد.

بعضی مطالعات نشان داده‌اند که تجویز گرلین در انسان بسته به ساعت نمونه گیری از خون باعث افزایش یا کاهش T_4 و نیز کاهش TSH را باعث شده است و در مطالعات دیگری عدم تأثیر آن بر هورمون‌های تیروئیدی آشکار شده است در حالی که در گزارشاتی تجویز حاد سیستمیک یا درون بطن مغزی گرلین باعث کاهش عملکرد محور هیپوتالامو-هیپوفیز-تیروئیدی شده است و تجویز مزمن چنین اثری را نشان نداده است. اما لپتین باعث افزایش غلظت T_3 (با تشدید تبدیل T_4) می‌شود و همچنین بر حسب وضعیت فیزیولوژیک (گرسنگی یا سیری) تأثیر لپتین متفاوت می‌باشد. [۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵]. لذا نتایج هنوز مورد بحث و در پژوهش‌های مختلف تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند. گاهی اوقات تأثیر همزمان دو هورمون منجر به خنثی سازی اثرات یکدیگر نشده ، بلکه ممکن است اثر دیگری را تشدید یا تضعیف کند. لذا بایستی همزمان هر دو هورمون تزریق شده تا به بررسی مسیر فیزیولوژیک جدید (تزریق لپتین بعد از گرلین) پرداخته و اثر هم افزایشی یا هم کاهشی را مورد بررسی قرار دهیم. هدف این تحقیق بررسی اثر بر هم کنش گرلین و لپتین از طریق تزریق داخل بطن مغزی و تأثیر مدت زمان تزریق این هورمون‌ها بر غلظت پلاسمایی هورمون‌های تیروئیدی (T_3 و T_4) می‌باشد.

مواد و روش ها

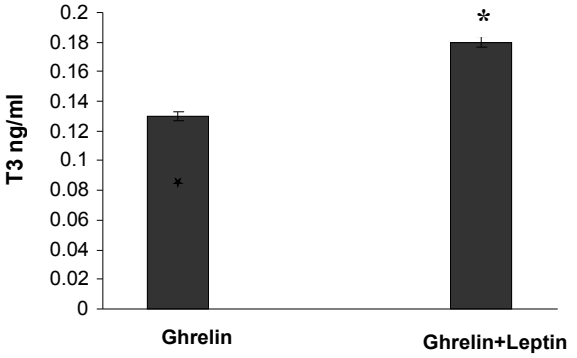
گرلین و لپتین (محصول شرکت Anaspect آمریکا) تهیه گردید. دستگاههای استفاده شده شامل دستگاه استرئوتاکسیک مدل Stoelting ساخت آمریکا، دستگاه سانتریفوژ مدل Segurita، دستگاه شیکر مدل Medec ساخت آمریکا، دستگاه شمارشگر اشعه گاما مدل Medec ساخت آمریکا و یخچال فریزر (۲۰-) برای نگهداری نمونه های پلاسمایی تا زمان تجزیه آزمایشگاهی می‌باشد. در این آزمایش از ۵۶ عدد رت نر بالغ از نژاد ویستار با وزن g ۲۵۰ – ۲۳۰ استفاده شد. در تمامی مدت آزمایش، آب لوله کشی شهری و غذای مخصوص رت آزادانه در اختیار حیوانات قرار داشت. دمای محل نگهداری حیوانات در حد ۲ ±۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۰٪ بود. رت ها همواره تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. این تحقیق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب و آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران، در سال ۱۳۸۶ انجام شد. در کلیه مراحل آزمایشی اصول و قوانین اخلاقی پذیرفته شده بین‌المللی و ملی رعایت شده است. حیوانات به طور تصادفی به ۷ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱، ۳ و ۵ نانومول گرلین را در حجم μl ۲ به مدت یک روز از طریق بطن جانبی مغز دریافت کردند و ۲۰ دقیقه بعد عمل خونگیری صورت گرفت. تیمارهای ۴، ۵ و ۶ به ترتیب ۱، ۵ و ۱۰ نانومول لپتین را در حجم μl ۲ به مدت یک روز از طریق بطن جانبی مغز دریافت کردند و ۲۰ دقیقه بعد عمل خونگیری صورت گرفت. تیمار ۷: روزانه ۵ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول لپتین را در حجم μl ۲ به مدت ۳ روز از طریق بطن جانبی مغز دریافت کردند. [۱۶، ۱۷، ۳۱ و

۳۲] بدین ترتیب که ابتدا گرلین و ۳-۲ دقیقه بعد لپتین تزریق می‌شد و ۲۰ دقیقه بعد عمل خونگیری صورت می‌گرفت. جهت انجام تزریقات بطور خلاصه ابتدا به کمک روش استرئوتاکسی و با استفاده از اطلس Paxinos & Watson، مختصات بطن جانبی مشخص (AP = - ۰/۸ mm و L = - ۱/۶ mm و DV = ۳/۲ mm) و کانول گذاری با استفاده از سرسرنگ درجه ۲۲ انجام و پس از انتقال هر حیوان به قفس انفرادی به مدت یک هفته به حیوان اجازه بهبودی داده می‌شد. برای تزریق از سر سرنگ شماره ۲۷ که به اندازه نیم میلیمتر بزرگ‌تر از کانول ساخته شده و از طریق لوله رابط پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری متصل و تزریقات در مدت دو دقیقه به آرامی از طریق کانول به بطن جانبی مغز حیوانات تزریق می‌گردید. برای خونگیری ابتدا حیوان در داخل دسیکاتور متصل به کپسول گاز CO_2 قرار داده شده و سپس عمل خونگیری با استفاده از لوله موئین هپارینی از سینوس غاری چشم به مدت ۵ روز (از ۱ روز قبل تا ۱ روز بعد از تزریقات) بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح صورت می‌گرفت. در هر بار خونگیری میزان خون گرفته شده به اندازه یک میلی لیتر بود. پلاسمای نمونه‌ها بلافاصله به کمک دستگاه سانتریفوژ تهیه و تا هنگام تجزیه آزمایشگاهی در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. در پایان آزمایشات با بیهوشی حیوانات توسط مخلوط کتامین و زایلازین و سپس پرفیوژن سالین و فرمالین برای اطمینان از محل صحیح کانول گذاری عمل برش گیری با دستگاه Vibroslicer در انستیتوی پاستور انجام شد و نمونه های برشی به قطر ۲۰۰- ۱۵۰ میکرومتر از بافت مغزی تهیه شد و محل تزریق مورد بررسی قرار گرفت تا برای تفسیر نتیجه آزمایشات تنها نمونه‌هایی که محل تزریق با مختصات مورد نظر تطابق داشت مورد استفاده قرار گیرند. میزان غلظت پلاسمایی هورمون‌های T_3 و T_4 با استفاده از روش RIA کیت های سنجش T_3 و T_4 شرکت تابشیار نور در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی اندازه‌گیری شد و برای تجزیه تحلیل و آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت. اجزا کیت T_3 عبارتند از: لوله های آزمایش کد شده با آنتی بادی T_3، یک ویال ۱۱ میلی لیتری محلول تغلیظ شده که حاوی T_3 نشاندار شده با I^{125} و بافر باربیتال ۰/۰۵ مول است. میزان رادیواکتیویته آن کمتر از ۲۵۰ KBg یا ۶/۸ Ci می‌باشد، یک ویال که جهت رقیق سازی معرف تریسر به کار می‌رود و استاندنداردهای T_3. دقت کیت برابر ۰/۱ ng/ml است. اجزای کیت T_4 عبارتند از: لوله های آزمایش کد شده با آنتی بادی T_4، یک ویال ۱۱ میلی لیتری محلول تغلیظ شده که حاوی T_4 نشاندار شده با I125 و بافر باربیتال ۰/۰۵ مول است. میزان رادیواکتیویته آن کمتر از ۲۵۰KBg یا ۶/۸ Ci می‌باشد، یک ویال که جهت رقیق سازی معرف تریسر به کار می‌رود و استاندنداردهای T_4. دقت کیت برابر ۰/۱ ng/ml است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن Dunken صورت گرفت. برای بررسی اثر گرلین، لپتین و برهم کنش آنها در هر روز در دوره قبل و بعد تزریق از آزمون T-test و برای مقایسه روزهای مختلف نیز از آزمون اندازه گیری چندگانه استفاده شد. انجام عملیات آماری و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزار SPSS و نرم افزار Excel 2003 انجام گرفت.

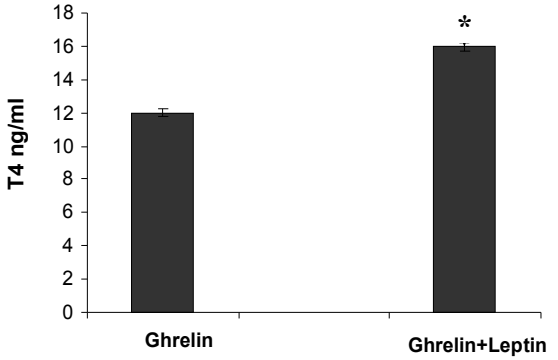
یافته ها

مقادیر به دست آمده از اثر تزریق درون بطنی گرلین نشان می‌دهد که تزریق ۱، ۳ و ۵ نانومول گرلین باعث کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 به ترتیب به میزان ۱۴٪، ۲۵٪ و ۳۸٪ در مقایسه با دوره قبل از تزریق می‌باشد. تجزیه تحلیل آماری نشان می‌دهد که تأثیر کاهنده دوزهای ۱ و ۳ نانومول گرلین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 بین دورهٔ قبل تزریق و دوره بعد اختلاف معنی داری ندارد. ولی دوز ۵ نانومول گرلین سبب کاهش معنی دار در میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 در دورهٔ بعد تزریق نسبت به دورهٔ قبل تزریق شد. مقادیر به دست آمده از اثر تزریق درون بطنی لپتین نشان می‌دهد که تزریق ۱، ۵ و ۱۰ نانومول لپتین باعث افزایش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 به ترتیب به میزان ۱۴٪، ۲۵٪ و ۴۵٪ در مقایسه با دورهٔ قبل تزریق می‌شود اما این افزایش توسط دوزهای ۱ و ۵ نانومول لپتین معنی دار نبود اما تزریق دز ۱۰ نانومول لپتین سبب افزایش معنی دار میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 در دورهٔ بعد تزریق نسبت به دورهٔ قبل تزریق شد.

نتایج به دست آمده از برهم کنش گرلین و لپتین بر



شکل ۱- مقایسه تأثیر گروه گرلین و گروه برهم کنش گرلین و لپتین بر میانگین غلظت هورمون T3. *: (P< ۰/۰۵). نتایج به صورت SEM گزارش شده‌اند.



شکل ۲- مقایسه تأثیر گروه گرلین و گروه برهم کنش گرلین و لپتین بر میانگین غلظت هورمون T4. *: (P< ۰/۰۵). نتایج بصورت SEM گزارش شده‌اند.

میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 نشان می‌دهد که تزریق همزمان درون بطنی ۵ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول لپتین باعث کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 به میزان ۱۸/۲٪ در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل از آن می‌شود. این کاهش غلظت، اختلاف معنی داری در میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_3 بین دوره قبل تزریق و دوره بعد تزریق نشان نمی‌دهد به عبارت دیگر لپتین سبب بلوکه کردن اثر مهاری گرلین بر غلظت پلاسمایی هورمون T_3 می‌شود.

همچنین، مقادیر به دست آمده از بر هم کنش ۵ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول لپتین نشان می‌دهد میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T3 در روز اول، دوم و سوم به ترتیب به میزان ۱۷/۳۹٪، ۱۹/۰۴٪ و ۱۸/۱۸٪ کاهش می‌یابد که این میزان کاهش در هر روز در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل تزریق معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵) ولی بین روزها اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود.

همچنین، مقایسه بین گروه گرلین و گروه برهم کنش گرلین و لپتین نشان می‌دهد که میانگین غلظت هورمون T_3 در گروه برهم کنش گرلین و لپتین در مقایسه با گروه گرلین به میزان ۳۸/۴٪ افزایش می‌یابد که این میزان افزایش از نظر آماری معنی دار می‌باشد. به عبارت دیگر لپتین اثر مهاری گرلین بر میانگین غلظت هورمون T_3 را به میزان ۳۸/۴٪ بلوکه می‌کند که این میزان از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵) [شکل ۱].

مقادیر به دست آمده از اثر تزریق درون بطن مغزی گرلین نشان می‌دهد که تزریق ۱، ۳ و ۵ نانومول گرلین باعث کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 به میزان ۱۷/۴٪، ۲۳/۸٪ و ۴۲/۹٪ در مقایسه با دوره قبل تزریق می‌شود. هنگام تزریق دزهای ۱ و ۳ نانومول گرلین در میزان کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 بین دورهٔ قبل تزریق و دوره بعد اختلاف معنی داری مشاهده نشد. ولی تزریق ۵ نانومول گرلین سبب کاهش معنی داری میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 در دورهٔ بعد تزریق نسبت به دورهٔ قبل تزریق شد. مقادیر به دست آمده از اثر تزریق درون بطن مغزی لپتین نشان می‌دهد که تزریق ۱، ۵ و ۱۰ نانومول لپتین باعث افزایش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 به ترتیب به میزان ۹٪، ۱۹٪ و ۳۸/۱٪ در مقایسه با دورهٔ قبل تزریق می‌شود. هنگام تزریق دزهای ۱ و ۵ نانومول لپتین در میزان افزایش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 بین دورهٔ قبل تزریق و دورهٔ بعد تزریق اختلاف معنی داری مشاهده نشد. ولی تزریق دوز ۱۰ نانومول لپتین سبب افزایش معنی دار میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 در دورهٔ بعد تزریق نسبت به دورهٔ قبل تزریق شد.

نتایج به دست آمده از برهم کنش گرلین و لپتین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 نشان می‌دهد که تزریق درون بطنی ۵ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول لپتین باعث کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 به میزان ۲۳/۸٪ در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل تزریق می‌شود. این کاهش غلظت، اختلاف معنی داری در میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 بین دوره قبل تزریق و دوره بعد تزریق نشان نمی‌دهد به عبارت دیگر لپتین سبب بلوکه کردن اثر مهاری گرلین بر غلظت پلاسمایی هورمون T_4 می‌شود.

همچنین، مقادیر به دست آمده از بر هم کنش ۵ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول لپتین نشان می‌دهد میانگین غلظت پلاسمایی هورمون T_4 در روز اول، دوم و سوم به ترتیب به میزان ۲۷/۲۷٪، ۲۵٪ و ۱۹/۰۴٪ کاهش می‌یابد که این کاهش در هر روز در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل تزریق معنی دار می‌باشد. ولی بین روزها اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود.

همچنین، مقایسه بین گروه گرلین و گروه برهم کنش گرلین و لپتین نشان می‌دهد که میانگین غلظت هورمون T_4 به میزان ۳۳/۳۳٪ افزایش می‌یابد که این میزان افزایش از نظر آماری معنی دار می‌باشد. به عبارت دیگر لپتین اثر مهاری گرلین بر میانگین غلظت هورمون T_4 را به طور معنی داری بازداری کرده است ($P<۰/۰۵$) [شکل ۲].

بحث

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد دوز موثر گرلین بر کاهش هورمون‌های تیروئیدی بر طبق مقالات [۳۲،۳۱،۱۶]، در این تحقیق نیز سبب کاهش معنی دار میانگین غلظت پلاسمایی هورمون‌های T_3 و T_4 در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل تزریق شد. کاهش مشاهده شده در T_3 و T_4 به ترتیب به میزان ۳۸٪ و ۴۲/۹٪ می‌باشد که میزان کاهش در T_4 بیشتر از T_3 است. همچنین نتایج نشان داد که افزایش روز تأثیری در میزان کاهش میانگین غلظت هورمون‌های تیروئیدی ندارد. نتایج حاصل از این تحقیق، منطبق بر مطالعات پیشین است. Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۰ کاهش معنی دار هورمون‌های تیروئیدی را به هنگام تزریق AgRP که در اثر تزریق گرلین افزایش می‌یابد در ۲۰ دقیقه بعد تزریق درون بطنی در موش صحرایی گزارش کردند [۱۶]. علیجانی در سال ۲۰۰۶ گزارش کرد که تزریق داخل وریدی گرلین در بزهای سانن ماده باعث کاهش معنی دار T_4 می‌گردد در حالی که کاهش T_3 معنی دار نبود. [۲۲] داوودی در سال ۲۰۰۶ کاهش معنی دار هورمون‌های T_3 و T_4 را در بزهای سانن ماده گزارش نمود [۵]. چندین مکانیسم احتمالی برای اثر گرلین در کاهش غلظت هورمونهای تیروئیدی وجود دارد: تزریق گرلین با افزایش بیان ژن‌های AgRP و NPY در هسته ARC هیپوتالاموس سبب افزایش اشتها می‌شود. [۱۳، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۸]. مشخص شده است نورون های NPY و AgRP از هسته ARC به طور مستقیم بر روی نورون های TRH در هسته PVN هیپوتالاموس (جایگاه اصلی نورون‌های TRH) متصل شده و بر روی نورون‌های TRH گیرنده دارند [۷، ۸، ۱۴، ۱۹] و تزریق درون بطنی AgRP و NPY هر دو سطح هورمون‌های تیروئیدی را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد [۷، ۸]. بنابراین، گرلین ممکن است از طریق افزایش NPY و AgRP سبب کاهش هورمون‌های تیروئیدی شود. مکانیسم دیگر بدین صورت است: گرلین سبب افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال (HPA) شده و باعث افزایش ترشح ACTH و کورتیزول می‌شود [۹]. افزایش فعالیت محور HPA به نوبه خود سبب کاهش فعالیت محور HPT می‌شود [۲۵]. چون CRH ترشح TSH را مهار می‌کند و کورتیزول هم ترشح TSH و تبدیل T_4 به T_3 را مهار کرده و مقدار rT_3 را افزایش می‌دهد و rT_3 هم اثر مهاری روی T_3 دارد. بنابراین، گرلین ممکن است با افزایش فعالیت HPA سبب کاهش غلظت پلاسمایی هورمون‌های تیروئیدی شود.

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد دوز موثر لپتین باعث افزایش میانگین غلظت هورمون‌های تیروئیدی در دوره بعد تزریق نسبت به دوره قبل تزریق شد ($P<۰/۰۵$). افزایش مشاهده شده در T_3 و T_4 به ترتیب به میزان ۴۵/۵٪ و ۳۸/۱٪ می‌باشد و میزان افزایش در T_3 بیشتر از T_4 است.

در خصوص مکانیسم اثر لپتین در افزایش هورمونهای تیروئیدی می‌توان گفت: لپتین با اتصال به گیرنده‌های خود (Ob-R) در سطح نورون های AgRp و NPY سبب هیپرپلاریزه شدن این نورون ها و مهار نوروترانسمیتر GABA شده و نورون های POMC را از حالت مهاری آزاد می‌کند [۱۴]. لپتین همچنین به گیرنده های خود در سطح نورون های POMC متصل شده و با دپلاریزه کردن این نورون ها سبب افزایش فعالیت آنها و افزایش هورمون‌های تیروئیدی می‌شود [۱۴].

علاوه بر این، نورون های α-MSH از هستهٔ ARC بر روی نورون های TRH هستهٔ PVN هیپوتالاموس اتصال داشته و روی نورون های TRH گیرنده دارند. تحقیقات نشان داده است تزریق α-MSH سبب افزایش هورمون‌های

تیروئیدی می‌شود و از آنجا که القاء α-MSH توسط لپتین صورت می‌گیرد بنابراین پیش بینی می‌شود لپتین با چنین مکانیسمی نیز سبب افزایش هورمونهای تیروئیدی شود [۱۷].

آنالیز حاصل از داده‌ها نشان داد تزریق داخل بطنی گرلین و لپتین به طور همزمان، اثر مهاری گرلین بر غلظت هورمون‌های T_3 و T_4 را به ترتیب به میزان ۳۸/۴٪ و ۳۳/۳٪ کاهش می‌دهد که این کاهش از نظر آماری معنی دار است ($P<۰/۰۵$). از آنجا که در این تحقیق، تأثیر لپتین بر عمل گرلین در مسیر تیروئیدی برای اولین بار بررسی شده است بنابراین، یافتن مکانیسم مربوطه نیاز به تحقیق و بررسی دارد. اما می‌توان دلایل احتمالی زیر را برای بلوکه شدن اثر مهاری گرلین بر هورمون‌های تیروئیدی توسط لپتین فرض کرد. همانطور که در مکانیسم احتمالی دوم گرلین در کاهش غلظت T_3 و T_4 آورده شده، گرلین سبب افزایش فعالیت محور HPA و در نهایت باعث کاهش فعالیت HPT می‌شود. احتمال می‌رود لپتین بر این مسیر تأثیر گذاشته و باعث کاهش یا حذف اثر گرلین می‌گردد و در نتیجه باعث بلوک اثر مهاری گرلین روی کاهش غلظت هورمونهای T_3 و T_4 می‌شود. به عنوان دلیل احتمالی دوم می‌توان گفت که گرلین یا لپتین مستقیماً بر گیرنده های دیگری بر روی سلولهای هستهٔ PVN هیپوتالاموس یا مسیر α-MSH اثر می‌کند. به عبارت دیگر هر جا یکی از این دو رسپتور قرار دارد شاید رسپتور دیگر عمل دیگری را آنتاگونیزه می‌کند.

نتیجه گیری کلی از این تحقیق بیانگر آن است که گرلین سبب کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون‌های T_3 و T_4 شده و لپتین توانسته است اثر مهاری گرلین بر غلظت هورمون‌های تیروئیدی را بلوکه کند.

سپاسگزاری

هزینه های لازم برای انجام این پژوهش توسط دانشگاه فردوسی مشهد و همچنین امکانات موجود در دانشگاه شهید بهشتی تأمین و فراهم گردید. از آقای غفاری مسئول اتاق حیوانات بخش علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

[1] Bhatti SFM, Duchateau L, Van Ham LML, Vliegher SPD, Mol JA, Rijnberk AD, Kooistra HS, Effects of growth hormone secretagogues on the release of adenohypophyseal hormones in young and old healthy dogs. ***Vet J*** 172 (2006) 515-25.

[2] Mantzoros CS, Moschos SJ, Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. ***Clin Endocrinol*** 49 (1998) 551-67.

[3] Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia- Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL, The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. ***Neuron*** 37 (2003) 649-61.

[4] Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mandal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M, Ghrelin a novel growth hormone- releasing acylated peptide is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. ***Endocrinology*** 141 (2000) 4255-61.

[5] Davoudi Zanjani Sh, The ***effect of Ghrelin on mean plasma concentrations of T3 and T4, body weight in Sanin female goats*** [thesis]. Tehran: Shahid Beheshti Univ., 2006.

[6] Farifteh F. ***The effect of Intravenous injection of Ghrelin on mean plasma concentrations of LH and FSH in Sanin female goats*** [thesis]. Tehran: Shahid Beheshti Univ., 2006.

[7] Fekete C, Kelly J, Mihaly E, Sarkar S, Rand WM, Legradi G, Emerson CH, Lechan RM, Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamus-Pituitary- Thyroid axis. ***Endocrinology*** 142 (2001) 2606-13.

[8] 8) Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM, Agouti- Related Protein (AgRP) has a central inhibitory action on the hypothalamus- Pituitary- Thyroid (HPT) axis;

Comparisons between the effect of AgRP and Neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. ***Endocrinology*** 143 (2002) 3846-53.

[9] 9) Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N, Ghrelin in neonatal rat: distribution in stomach and its possible role. ***J Endocrinol*** 173 (2002) 239-45.

[10] 10) Holst B, Hollidoy ND, Bach A, Elling CE and Cox HM, Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. J Bio Chem.2004: 279:53806-17.

[11] 11) Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Ghrelin and des- acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. ***Biochem Biophys Res Commun*** 279 (2000) 909-13.

[12] 12) Bullock J, Boyle J, Wang MB., ***Physiology.*** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

[13] 13) Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayachi I, Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-Related protein mRNA levels and body weight in rats. ***Diabetes*** 50 (2001) 2438-43.

[14] 14) Ellacott K, Cone R, The central Melanocortin System and the integration of short-and long-term regulation of energy homeostasis. ***Endocr Rev*** 59 (2004) 395-408.

[15] Kawano H, Masuko S, Beta- endorphin adrenocorticotrophic hormone and neuropeptide Y-containing projection fibers from the arcuate hypothalamic nucleus make synaptic contacts on to nucleus preopticus medianus neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. ***Neuroscience*** 98 (2000) 555-63.

[16] Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DGA, Seal LJ, Kong WM, Edwards CMB, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA, Bloom SR, The central melanocortin system affects the hypothalamic- Pituitary- Thyroid axis and may mediate the effect of leptin. ***J Clin Invest*** 105 (2000) 1005-11.

[17] Kojima M, Kangawa K, Ghrelin: structure and function. ***Physiol Rev*** 85 (2005) 495-522.

[18] Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM, Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. ***Endocrinology*** 143 (2002) 155-62.

[19] Legradi G, Lechan RM, Agouri- Related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. ***Endocrinology*** 140 (1999) 3643-52.

[20] Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S, A role for ghrelin in the central regulation of feeding. ***Nature*** 409 (2001) 194-8.

[21] Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JCG, Blundell JE, Orexins and appetite regulation. ***Neuropeptides*** 36 (2002) 303-25.

[22] Seyyed Alijani S. ***The effect of Intravenous injection of Ghrelin on mean plasma concentration of T3 and T4, weight gain and milk production in Sanin female goats in different energetic levels*** [Thesis]. Tehran: Shahid Beheshti Univ., 2006.

[23] Shintani M, Ogaway E, Ebiharak K, Aizawa Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Ghrelin an endogenous growth hormone secretagogue is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. ***Diabetes*** 50 (2001) 227-32.

[24] Shor-Posner G, Azar AP, Jhanwar- Uniyal M, Filart R, Leibowitz SF, Destruction of noradrenergic innervation to the paraventricular nucleus: deficits in food intake, macronutrient selection, and compensatory eating after food deprivation. ***Pharmacol Bio Chem* & Behav** 25 (1986) 381-92.

[25] Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ, The stress in the human brain in depression and neurodegeneration. ***Ageing Res Rev*** 4 (2005) 141-94.

[26] Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakuara H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu K, Kojima M, Kangawa K, Nakazo K, Ghrelin strongly stimulates growth hormone(GH) release in humans. ***J Clin Endocrinol & Metab*** 85 (2000) 4908-11.

[27] Tena Sempere M, Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. ***Growth Horm IGF Res*** 15 (2005) 83-8.

[28] Wang L, Saint- Pierre DH, Tache Y, Peripheral ghrelin selectively increases FOS expression in neuropeptide Y synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. ***Neurosci Lett*** 325 (2002) 47-51.

[29] Wilson JD, Foster DW, ***textbook of endocrinology***. Philadelphia: Saunders Company, 1998.

[30] 30) Wittmann G, Sarkar S, Hrabovszky E, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C, Galanin- but not galanin- like peptide-containing axon terminals innervate hypophysiotropic TRH- synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. ***Brain Res*** 50 (2004) 43-50

[31] Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DGA, Ghatei MA Bloom SR, The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake and Growth Hormone Secretio. ***Endocrinology*** 141 (2000) 4325-28.

[32] Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanely SA, Ghatei MA, Bloom SR, Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. ***Diabetes*** 50 (2001) 2447-50.

[33] Kluge M, Riedl S, Uhr M, Schmidt D, Zhang X, Yassouridis A, Steiger A, Ghrelin affects the hypothalamus–pituitary–thyroid axis in humans by increasing free thyroxin and decreasing TSH in plasma. ***Eur J Endocrinol*** 162 (2010) 1059-65.

[34] Ruscica M, Dozio E, Gandini S, Gnocchi P, Devalle GG, Motta M, Roti E, Magni P, Total free and bound leptin and thyroid function in elderly women with different body weights. ***Clin Endocrinol*** 68 (2008) 1002-08.

Wang L, Shao YY, Ballock RT, Leptin synergizes with thyroid hormone signaling in promoting growth plate chondrocyte proliferation and terminal differentiation in vitro. ***Bone*** 48 (2011) 1022-27.