مقاله پژوهشی

اثر نوروپپتید اسپکسین بر عملکرد محور هیپوفیز – گوناد و فولیکول‌های تخمدانی در موش‌های صحرایی ماده بالغ

اعظم صحراگرد، سید ابراهیم حسینی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: نوروپپتیدها در اعمال مختلفی ازجمله در تنظیم عملکرد سیستم تولیدمثلی دخالت دارند. با توجه به شیوع اختلالات تولیدمثلی در سراسر جهان، این مطالعه باهدف تعیین اثر نوروپپتید اسپکسین بر عملکرد محور هیپوفیز-گوناد در موش‌های صحرایی ماده بالغ انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی ماده بالغ استفاده گردید که به گروه‌های کنترل، شاهد و ۳ دسته تجربی دریافت‌کننده اسپکسین با دوزهای ۵، ۲۵ و ۵۰ µg/ kg تقسیم شدند. کلیه تجویزها برای مدت ۵ روز و به‌صورت درون صفاقی انجام گرفت. در پایان پس از خون‌گیری از حیوانات جهت اندازه‌گیری هورمون‌های FSH، LH و استرادیول، پروژسترون و تستوسترون، تخمدان‌های آن‌ها خارج و پس از تهیه مقاطع بافتی فولیکول‌ها با تکنیک دیسکتور فیزیکی شمارش گردیدند. داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار SPSS-18 و از طریق آزمون‌های ANOVA و Duncan مورد آنالیز قرار گرفتند و معناداری اختلاف داده‌ها در سطح $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج نشان داد که اسپکسین در هر ۳ دوز باعث افزایش معنادار FSH، تعداد فولیکول‌های چندلایه، آنترال، اجسام زرد و کاهش معنادار پروژسترون، تعداد فولیکول‌های آترتیک و گرآف در سطح $P<0/01$ و در دوزهای ۲۵ µg/ kg و ۵۰ باعث کاهش LH و در دوز ۲۵ µg/ kg باعث افزایش معنادار تستوسترون در سطح $P<0/05$ و در دوز ۵۰µg/ kg باعث افزایش معنادار تعداد فولیکول‌های تک لایه در سطح $P<0/01$ نسبت به گروه کنترل می‌گردد.

نتیجه‌گیری: اسپکسین از طریق افزایش میزان سرمی FSH باعث افزایش فولیکول‌های چندلایه و آنترال تخمدانی و به دلیل کاهش غلظت سرمی LH باعث کاهش سطح سرمی پروژسترون می‌شود.

کلمات کلیدی: اسپکسین، استرادیول، پروژسترون، تستوسترون، فولیکول‌های تخمدانی، موش صحرایی

مقدمه

نوروپپتیدها ترکیباتی هستند که در اعمال مختلفی در بدن ازجمله در تنظیم وقایع تولیدمثلی و در تمام مراحل عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گوناد دخالت داشته و دارای یک نقش کلیدی در هیپوتالاموس و کنترل تولیدمثل می‌باشند (۱). اسپکسین یک پپتید ترشحی ۱۴ آمینواسیدی است که از بیان ژن $C_{12}ORF_{39}$ تولید می‌شود (۲) و در بررسی‌های به‌عمل‌آمده به‌وسیله تکنیک RT-PCR، بیان شدید این ژن در جفت و نواحی مختلف مغز، بیان متوسط آن در کلیه و بیضه‌ها و به میزان کم در پانکراس، ریه، تخمدان، مری، کولون، پروستات، قلب، طحال، کبد و معده اثبات شده است (۳). هم‌چنین وجود این پپتید در ویلی‌های تروفوبلاست‌ها که نقش مهمی در تبادلات جنینی-مادری و فعالیت‌های آندوکرین درگیر در اعمال هومئوستاز بارداری دارند نشان داده شده است (۲ و ۳). بر اساس نتایج حاصل از یک مطالعه، میزان بیان ژن اسپکسین در مری، مغز، هیپوتالاموس، تیروئید، تخمدان، کبد، کلیه و پانکراس ۱۰ برابر بیشتر از بیان این ژن در معده، ماهیچه‌های اسکلتی، قلب، رحم، ریه، طحال، بیضه و غدد آدرنال است (۴). مطالعات اخیر پیشنهاد می‌نمایند که اسپکسین به‌عنوان یک هورمون پپتیدی ممکن است، در تنظیم عملکردهای قلبی عروقی، کلیوی و تنظیم آب و نمک در بدن نقش داشته باشد (۵ و ۶). پپتید اسپکسین در ابتدا به‌صورت یک مولکول پروتئینی پیش ساز بزرگ تولید و سپس به دو پپتید به اسامی Spexin/ NPQ ($_{Nwtpqaml\ YlkgaQ\text{-}NH2}$) و $NPQ_{53\text{-}70}$ ($_{FisdqSRRKDLSDRPLE}$) شکسته می‌شود که هر دو دارای فعالیت بیولوژیکی می‌باشند، به‌طوری‌که بعد از تزریقات درون

***نویسنده مسئول: سیدابراهیم حسینی**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران Email: ebrahim.hossini@yahoo.com

وریدی و درون بطنی هریک از این دو پپتید، اثرات مشابهی با آنژیوتانسین II بر بافت‌های کلیوی و قلبی و عروقی برجای می‌گذارند. مطالعه دیگر ما نیز نشان داد که داروی والسارتان به‌عنوان آنتاگونیست آنژیوتانسین II با مهار ترشح هورمون‌های گونادوتروپینی و مسدود نمودن اثر آن‌ها بر سلول‌های فولیکولی باعث کاهش هورمون‌های جنسی می‌گردد (۷). هم‌چنین مشخص شده است که هر دو پپتید حاصل از شکسته شدن نوروپپتید اسپکسین، بعد از تزریق درون بطنی در تست عقب کشیدن دم موش در آب گرم، دارای فعالیت ضددردی از مسیرهای غیر وابسته به سیستم‌های اوپیوئیدی می‌باشند (۵). اخیراً فعالیت تحریکی اسپکسین بر روی گیرنده‌های گالانین و همچنین شباهت نسبی بین ساختار ژنی اسپکسین با گیرنده‌های نوع ۲ و ۳ گالانین گزارش شده است و از اسپکسین به‌عنوان لیگاند طبیعی آن نیز نام برده می‌شود (۸). در یک مطالعه نشان داده شده است که میزان بیان ژن نوروپپتید اسپکسین در برخی از نواحی هیپوتالاموس نوعی ماهی، متعاقب مصرف غذا، افزایش می‌یابد به‌طوری‌که تزریق داخل مغزی آن، باعث مهار رفتارهای تغذیه‌ای پایه و همچنین القاء شده با تزریق نوروپپتید Y و Orexin می‌شود و به‌عنوان فاکتور مهارکننده تغذیه و اشتها در بخش‌های مختلف مغز به‌حساب می‌آید (۸). در یک بررسی در نوعی ماهی (Schizothorax prenanti) نشان داده شده است که قبل از وعده‌های غذایی در این ماهیان و در حالت گرسنگی میزان بیان ژن اسپکسین در مغز قدامی کمتر از مواقعی است که غذا به بدن رسیده است و این حاکی از اثرپذیری بیان ژن آن توسط وضعیت‌های متابولیکی و تغذیه‌ای در این نوع ماهی است (۱۰). نشان داده شده است که سطح سرمی اسپکسین در افراد مبتلا به بیماری دیابت نوع ۲ بسته به میزان گلوکز ناشتای خون، تری گلیسرید، کلسترول LDL و هموگلوبین گلیکوزیله شده در آن‌ها کاهش می‌یابد لذا این نوروپپتید می‌تواند در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ نقشی در متابولیسم لیپیدها و گلوکز ایفا نماید (۱۱). نشان داده شده است اسپکسین، به‌عنوان یک هورمون جدید در تنظیم وزن بدن و تعادل متابولیکی در انسان دخالت دارد (۱۲). با توجه به نتایج حاصل از یک مطالعه مشخص شده است که از بین رفتن تعادل متابولیکی در بیماران دیابتی باعث بروز اختلال در سیستم تولیدمثلی می‌گردد (۱۳). ازآنجاکه فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گوناد به‌وسیله نوروپپتیدها و یا هورمون‌های مختلفی ازجمله نوروپپتید Y (۱۴)، کیس پپتین‌ها (۱۵ و ۱۶)، گرلین (۱۷) و secretogranin II (۱۸) تحریک می‌شود و به‌وسیله فاکتورهایی نظیر دوپامین و Gonadotropin-inhibitory hormone GnIH() مهار می‌گردد (۱۹ و ۲۰) و هم‌چنین با توجه به آن‌که ناباروری یکی از مسائل مهم علم پزشکی است که در بسیاری از موارد به دلیل کمبود سلول‌های جنسی و یا هم به خوردن تعادل متابولیکی در بدن ایجاد می‌شود (۲۱ و ۱۳) و با عنایت به نقش مهم تعادل متابولیکی در سلامت عملکرد سیستم تولیدمثلی و با توجه به نقش مهمی که اسپکسین در تعادل متابولیکی بدن دارد و به دلیل آن‌که تاکنون تحقیق چندانی در ارتباط با نقش این نوروپپتید بر عملکرد سیستم تولیدمثلی حیوانات ماده صورت نگرفته است لذا این مطالعه باهدف بررسی اثر این نوروپپتید بر میزان هورمون‌ها و سلول‌های دودمانی جنسی در موش‌های صحرایی ماده بالغ انجام گرفت.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی تجربی است که در سال ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز انجام شد. در این مطالعه از ۴۰ سر موش صحرایی ماده بالغ و باکره از نژاد اسپیراگ دالی در محدوده‌ی وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم و سن ۹۰ تا ۱۰۰ روز استفاده شد. در طول دوره آزمایش، همه حیوانات از آب و غذای یکسان و بدون محدودیت برخوردار بوده و در یک اتاق مخصوص در دمای ۲±۲۰ درجه سلسیوس و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه تحت شماره IR.miau-۱۳۹۵۲۰۰۴ به تصویب رسید. در این تحقیق پس از هم سیکل سازی موش‌های ماده (۲۲)، نمونه‌ها به ۵ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ تقسیم شدند. در این مطالعه حیوانات گروه کنترل تحت هیچ نوع تیماری قرار نگرفتند و حیوانات گروه شاهد نیز به مدت ۵ روز تحت تیمار روزانه ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک به‌عنوان حلال دارو قرار گرفتند و گروه‌های تجربی ۱ تا ۳ نیز به مدت ۵ روز به ترتیب تحت تیمار روزانه ۵ و ۲۵، ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن داروی اسپکسین ساخت شرکت American peptide کشور آمریکا قرار گرفتند (۲۳). کلیه تجویزها به‌صورت درون صفاقی انجام گرفت. در پایان دوره آزمایش ابتدا جهت سنجش میزان سرمی هورمون‌های LH, FSH، تستوسترون، استروژن و پروژسترون پس از بی‌هوش نمودن موش‌ها به‌وسیله اتر، با استفاده از سرنگ

انسولینی در ساعات بین ۸ تا ۹ صبح از قلب آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد و آنگاه به‌منظور شمارش فولیکول‌های تخمدانی با تشریح حیوانات اقدام به جداسازی تخمدان‌ها گردید. در این بررسی جهت تهیه سرم خونی موردنیاز ابتدا به مقدار کافی از خون حیوانات را در لوله‌های آزمایش به‌طور آهسته ریخته و تا هنگام تشکیل لخته در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند و آنگاه به‌وسیله سواب لخته خون از جدار لوله آزمایش جدا گردید و سپس نمونه‌های خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند و سرم‌های تهیه‌شده تا قبل از سنجش میزان هورمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مطالعه میزان هورمون‌های LH، FSH به روش الایزا (ELISA) و تستوسترون، استروژن و پروژسترون با روش رادیوایمونواسی (RIA) و با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مدل Hiperion NP4 plus اندازه‌گیری گردیدند. کیت‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری هورمون‌های LH، FSH با مارک Cusabio ساخت کشور چین و برای هورمون‌های تستوسترون، استروژن و پروژسترون با مارک IBL, GmbH ساخت کشور آلمان تهیه گردید. به‌منظور بررسی میانگین تعداد فولیکول‌های تخمدانی نیز پس از جداسازی تخمدان‌ها، جهت تهیه مقاطع بافتی به ترتیب مراحل آب‌گیری توسط اتانول، شفاف‌سازی با الکل گزیلول و قالب‌گیری انجام گردید و سپس با کمک دستگاه میکروتوم دوار (LEIYZ استرالیا مدل ۱۵۱۲) مقاطع بافتی باضخامت ۵ میکرونی تهیه و سپس مقاطع تهیه‌شده بر روی لام آغشته به چسب albumen Egg منتقل و جهت خشک شدن آن‌ها بر روی پلیت داغ با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس جهت رنگ‌آمیزی مقاطع تهیه‌شده از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده شد. پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی آن‌ها با کمک میکروسکوپ نیکون ساخت کشور ژاپن اقدام به شمارش فولیکول‌های فوق گردید. در این بررسی برای محاسبه تعداد فولیکول‌ها (محاسبه استریولوژیک تعداد فولیکول‌های تخمدانی) از تکنیک دیسکتور فیزیکی استفاده گردید. برای انجام این تکنیک، تصویر دو مقطع بافتی پشت سر هم توسط دو پروژکتور روی میز کار انداخته شد و تصویر مقطع اول به‌عنوان مرجع و مقطع دوم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس برای شمارش، یک ترانسپرنت متشکل از فریم‌هایی با ابعاد ۱۳×۱۳ میلی‌متر به‌طور تصادفی روی نمونه قرار گرفت. این فریم دارای یک خط آزاد (نقطه‌چین) و یک خط ممنوعه (پررنگ) است. فولیکول‌هایی شمارش گردیدند که اولاً با خط ممنوعه برخورد نداشته باشند، ثانیاً در تصویر مقطع شاهد هم مشاهده نشوند. بر این اساس تعداد فولیکول‌ها شمارش گردید و با استفاده از فرمول زیر تعداد فولیکول‌های تخمدانی محاسبه گردید و با ضرب نمودن تعداد فولیکول‌ها در حجم مرجع، تعداد کل فولیکول‌ها به دست آمد (۲۴).

$$N = N_v \times V_{(Ref)}$$

که در آن N تعداد کل، N_v تعداد اجزا در واحد حجم، $V_{(Ref)}$ حجم کل بافت (نمونه) که نتیجه استفاده از روش کاوالیری است.

$$V = \sum_{i=1}^{m} P \times a(\mathrm{P})\,\mathrm{X}_t$$

که در آن V حجم، $\sum P$ مجموع نقاط برخورد کرده با قسمت موردنظر، $a(P)$ مساحت اطراف هر نقطه، t ضخامت برش‌ها و $a(P)\,\mathrm{X}_t$ حجم متعلق به فضای اطراف یک نقطه تقاطعی است و سپس نتایج با استفاده از آزمون‌های تجزیه واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی دانکن و با کمک نرم‌افزار آماری SPSS-۱۸ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و معناداری اختلاف داده‌ها در سطح p≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های این مطالعه نشان داد که داروی اسپکسین در هر ۳ دوز مورداستفاده باعث افزایش میزان سرمی هورمون FSH و کاهش هورمون پروژسترون در سطح P<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل می‌شود. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد که داروی اسپکسین در دوز ۵µg/ kg تأثیر معناداری بر میزان سرمی هورمون LH ندارد درحالی‌که دردوزهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش میزان سرمی هورمون LH در سطح P<۰/۰۵ می‌شود. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که این دارو تأثیر معناداری بر میزان سرمی هورمون استروژن ندارد و تنها در دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث افزایش معنادار هورمون تستوسترون در سطح P<۰/۰۵ می‌شود (جدول ۱). به‌علاوه بر اساس آنالیز داده‌های این مطالعه مشخص گردید که داروی اسپکسین بر تعداد فولیکول‌های اولیه تأثیر معناداری ندارد و تنها در دوز ۵۰µg/ kg باعث افزایش معنادار تعداد فولیکول‌های تک لایه در سطح

جدول ۱- مقایسه میزان هورمون‌های جنسی در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل (خطای معیار ± میانگین)

هورمون‌ها / گروه‌ها	(Iu/L)LH	(Iu/L)FSH	پروژسترون (ng/ml)	استرادیول (ng/ml)	تستوسترون (ng/ml)
کنترل	۵ /۰±۷۵ /۶۹	۲ /۰±۸۴ /۱۶	۳۷ /۱±۷۵ /۴۹	۴۵ /۱±۰۰ /۳۵	۰ /۰±۸۰ /۰۱
شاهد	۵ /۰±۸۲ /۳۱	۲ /۰±۴۹ /۲۹	۳۸ /۱±۶۴ /۵۹	۴۶ /۱±۴۰ /۳۶	۰ /۰±۸۳ /۰۳
تجربی ۱ (اسپکسین ۵µg/ kgBW)	۶ /۰±۸۲ /۲۹	۵/۰±۴۰ /۸۷**	۲۴ /۳±۵۰ /۵۲**	۴۴ /۲±۷۵ /۴۶	۰ /۰±۶۹ /۱۲
تجربی ۲ (اسپکسین ۲۵µg/ kgBW)	۳/۰±۲۹ /۳۷*	۶ /۰±۷۰ /۱۸*	۲۳ /۲±۸۸ /۹۹**	۳۸ /۱±۴۰ /۴۲	۰ /۰±۹۴ /۰۳*
تجربی ۳ (اسپکسین ۵۰µg/ kgBW)	۲ /۰±۵۶ /۷۴*	۶ /۰±۵۵ /۴۷**	**۱۷ /۳±۹۷ /۶۵	۴۶ /۴±۷۵ /۹۲	۰ /۰±۸۱ /۰۱

* نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح P<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل
** نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح P<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل

P<۰/۰۱ و در هر ۳ دوز مورداستفاده باعث افزایش معنادار تعداد فولیکول‌های چندلایه، آنترال و اجسام زرد و کاهش معنادار تعداد فولیکول‌های آترتیک و گرآف در سطح P<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل می‌گردد (جدول ۲).

میزان سرمی هورمون استروژن تأثیر معناداری ندارد. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد که داروی اسپکسین تعداد فولیکول‌های تک لایه، چندلایه، آنترال و اجسام زرد را افزایش و تعداد فولیکول‌های آترتیک و گرآف را کاهش می‌دهد و بر

جدول۲- مقایسه تعداد سلول‌های دودمانی جنسی در گروه‌های تیمار شده با اسپکسین نسبت به گروه کنترل (خطای معیار ± میانگین)

دودمان سلولی / گروه‌ها	فولیکول‌های اولیه	فولیکول‌های تک لایه	فولیکول‌های چندلایه	فولیکول‌های آنترال	فولیکول‌های آترتیک	فولیکول‌های گراف	جسم زرد
کنترل	۸/۱±۲۰/۹۶	۳/۰±۶۰/۵۱	۶/۱±۸/۶۵	۶/۱±۸/۳۲	۶ /۰±۲/۷۲	۱/۰±۶ /۱۵	۷/۰±۸/۵۸
شاهد (تیمار با حلال دارو)	۹/۲±۲۰/۲۲	۳/۱±۶۰/۶۳	۶/۱±۴/۵۷	۸/۱±۸/۹۴	۵ /۰±۶/۱۱	۱/۰±۴ /۰۱	۶/۰±۸/۵۸
تجربی ۱ (اسپکسین ۵µg/ kgBW)	۹/۱±۴۰/۳۶	۴/۱±۸۰/۶۸	*۱۳/۱±۶/۸۱	*۱۴/۰±۴/۶۰	*۲ /۰±۴/۱۳	*۰/۰±۷ /۱۸	*۱۱/۱±۲/۰۲
تجربی ۲ (اسپکسین ۲۵µg/ kgBW)	۹/۱±۴۰/۳۳	۳/۰±۶۰/۶۰	*۱۳/۱±۰/۹۲	*۱۷/۱±۴/۴۴	*۲/۰±۲/۱۹	*۰/۰±۲ /۲۰	*۱۰/۰±۲/۵۹
تجربی ۳ (اسپکسین ۵۰µg/ kgBW)	۹/۱±۴۰/۴۳	*۱۱/۲±۲۰/۵۹	*۱۴/۱±۴/۲۹	*۱۷/۱±۲/۵۹	*۱/۰±۸/۱۶	*۰/۰±۶ /۱۰	*۱۱/۰±۰/۹۲

* نشان‌دهنده تفاوت معنادار در سطح P<۰ /۰۱ با گروه کنترل است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد که داروی اسپکسین به‌صورت وابسته به دوز باعث افزایش میزان سرمی هورمون تستوسترون و هم‌چنین افزایش میزان سرمی FSH در هر ۳ دوز مورد استفاده می‌گردد. به‌علاوه داروی اسپکسین به‌صورت وابسته به دوز باعث کاهش میزان سرمی هورمون LH و در هر ۳ دوز مورد استفاده نیز موجب کاهش معنادار هورمون پروژسترون می‌گردد و بر

فولیکول‌های اولیه تأثیر معناداری ندارد. لذا عدم تغییرات معنادار در میزان سرمی هورمون استروژن در این مطالعه علی‌رغم افزایش تعداد فولیکول‌های تک لایه، چندلایه و آنترال را می‌توان به دلیل کاهش تعداد فولیکول‌های گرآف که نقش مهمی در ترشح هورمون استروژن دارند، نسبت داده شود. برخلاف نتایج حاصل از این مطالعه در یک بررسی دیگر نشان داده شد که اسپکسین قادر به تغییر در میزان ترشح هورمون GnRH در هیپوتالاموس

و هورمون‌های LH و FSH در هیپوفیز نیست (۲۵). هم سو با نتایج حاصل از این بررسی در مطالعات انجام‌شده در شرایط in vivo و in vitro نشان داده شده است که در ماهیان، داروی اسپکسین باعث مهار ترشح هورمون LH می‌گردد و بیان هیپوتالاموسی ژن اسپکسین نیز تحت تأثیر هورمون‌های گنادی قرار می‌گیرد و لذا این نوروپپتید می‌تواند نقش مهمی در تنظیم فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد داشته باشد (۲۶). هم سو با نتایج مطالعه حاضر در یک بررسی دیگر نشان داده شد تجویز اسپکسین به محیط کشت هیپوفیز باعث توقف ترشح هورمون LH می‌گردد (۲۷). لذا با توجه به اثر تحریکی هورمون LHبر ترشح هورمون پروژسترون کاهش میزان این هورمون در پژوهش حاضر نیز علی‌رغم افزایش تعداد اجسام زرد، دور از انتظار نیست. دریک بررسی نشان داده شد که گالانین از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم بیان ژن و ترشح هورمون LH را تنظیم می‌نماید و از این راه نقش مهمی در کنترل هورمونی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد دارد (۲۸). به‌علاوه در یک مطالعه دیگر نیز نشان داده شده است که در شرایط رژیم غذایی پرکالری مصرف گالانین باعث کاهش میزان گنادوتروپین‌ها می‌شود (۲۹) و ازآنجاکه اسپکسین به‌عنوان آگونیست گیرنده‌های گالانین به‌حساب می‌آید (۸) لذا تغییرات هورمونی مشاهده‌شده در گروه‌های دریافت‌کننده این نوروپپتید احتمالاً از طریق اثر بر گیرنده‌های گالانین قابل توجیه است. نشان داده شده است که تجویز Orexin در دوزهای بالا و در فاز استروس خوکچه‌هندی در تنظیم عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان دارای نقش کلیدی است (۳۰) و ازآنجاکه اسپکسین دارای اثر مهاری بر فعالیت Orexin است (۹) لذا احتمالاً تغییرات هورمونی مشاهده‌شده در پژوهش حاضر به‌ویژه کاهش وابسته به دوز هورمون LH از طریق اثر مهاری اسپکسین بر عملکردOrexin اعمال شده است.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات، روشن شده است که میزان بیان هیپوتالاموسی ژن اسپکسین به‌طور معناداری در فصول تولیدمثلی پایین‌تر است و با توجه به اثر مهاری این نوروپپتید بر عملکرد محور تولیدمثلی و بیان اندک ژن آن در زمان تولیدمثل، میزان بالای LH را در طی فصول تولیدمثل منجر می‌شود؛ زیرا که تزریق درون صفاقی اسپکسین باعث توقف ترشح هورمون LH و کاهش میزان سرمی این هورمون می‌گردد (۲۶). اسپکسین که ژن آن در روند تکامل در گونه‌های مختلف جانوری به مقدار بسیار زیادی محفوظ مانده است نقش‌های مهمی در مهار عملکرد محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد در ماهیان استخوانی دارد، اما برای تعمیم این اثر آن به سایر گونه‌های جانوری ازجمله پستانداران بررسی‌های بیشتری موردنیاز است (۲۶). محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد نقش اصلی را در کنترل سیستم تولیدمثلی مهره‌داران بازی می‌کند (۳۰). نشان داده شده است که ترشح هورمون‌های LH و FSH به‌وسیله هورمون GnRH هیپوتالاموسی افزایش می‌یابد (۳۱) و با عنایت به آن‌که ژن اسپکسین در بافت‌های مختلف نظیر غدد آدنوهیپوفیز، تیروئید، آدرنال، سلول‌های لایدیگ بیضه، بخش‌های مختلف تخمدان، هسته‌های پره اپتیک و جنب بطنی هیپوتالاموس، بیان می‌شود و دارای نقش‌های نوروترانسمیتری، نورومدولاتوری و آندوکرینی است (۳۲) لذا انتظار می‌رود که بر فعالیت ترشحی و ساختار بافتی تخمدان‌ها نیز تأثیر داشته باشد و تغییرات ایجادشده در تعداد فولیکول‌های تخمدانی در پژوهش حاضر نیز احتمالاً از طریق تأثیر اسپکسین بر گیرنده‌های اختصاصی خود در بافت تخمدان‌ها و یا از طریق تغییر در میزان سرمی هورمون‌های گنادوتروپینی اعمال شده است. بر اساس نتایج یک بررسی، اسپکسین احتمالاً از طریق اثر بر رسپتورهای آنژیوتانسین II باعث افزایش فشارخون سرخرگی می‌گردد (۳۳). هم‌چنین مطالعه دیگر ما نشان داد که والسارتان به‌عنوان آنتاگونیست رسپتورهای Ang II، با مهار ترشح هورمون FSH و بلوکه نمودن اثر آن بر سلول‌های فولیکولی، باعث کاهش هورمون‌های جنسی ماده می‌گردد (۷). لذا احتمالاً داروی اسپکسین از طریق تحریک گیرنده‌های آنژیوتانسین II باعث افزایش میزان هورمون FSH و تعداد فولیکول‌های در حال رشد و کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک شده است. در پژوهش حاضر نشان داده شد که داروی اسپکسین باعث افزایش هورمون FSH می‌گردد و با توجه به اثر تحریکی این هورمون بر رشد فولیکول‌های تخمدانی (۳۴)، افزایش تعداد فولیکول‌های تک لایه، چندلایه، آنترال و کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک احتمالاً به دلیل افزایش میزان سرمی هورمون FSH است. نشان داده شده است گیرنده گالانین موجود در بیضه و تخمدان بر روند عملکرد سیستم تولیدمثلی جانوران دارای اثر تحریکی است (۳۵). لذا با عنایت به این‌که اسپکسین به‌عنوان لیگاند گیرنده‌های گالانین به‌حساب می‌آید بنابراین در پژوهش حاضر اگرچه داروی اسپکسین باعث کاهش هورمون LH شده است اما افزایش تعداد اجسام زرد و کاهش فولیکول‌های

گرآف احتمالاً مستقل از اثر تحریکی این هورمون بر اوولاسیون و تبدیل فولیکول‌های گرآف به اجسام زرد است و بیشتر به دلیل اثر اسپکسین برگیرنده‌های گالانینی موجود در فولیکول‌های تخمدانی و تسریع در رشد آن‌ها و تبدیل فولیکول‌های گرآف به اجسام زرد است.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر اسپکسین از طریق افزایش غلظت سرمی FSH و احتمالاً از طریق گیرنده اختصاصی خود و هم‌چنین گیرنده‌های گالانینی در بافت‌های تخمدانی باعث افزایش فولیکول‌های تک لایه، آنترال و چندلایه و اجسام زرد می‌شود و از طریق کاهش میزان سرمی LH باعث کاهش سطح سرمی هورمون پروژسترون می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی خانم اعظم صحراگرد دانش‌آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز با کد کمیته اخلاق به شماره ۱۳۹۵۲۰۰۴-IR.miau است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از معاونت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به خاطر فراهم آوردن امکانات این مطالعه تقدیر و تشکر نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Manisha MA, Saxena RN.Galanin regulation of LH release in male rats.Indian journal of Experimental Biology. 2010;48(6):544-8.
2. Mirabeau O, Perlas E, Severini C, Audero E, Gascuel O, Possenti R, et al. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. Genome Res. 2007;17(3):320-7.
3. Wan B, Wang XR, Zhou YB, Zhang X, Huo K, Han ZG. C12ORF39, a novel secreted protein with a typical amidation processing signal.Biosci Rep.2010; 30(1):1-10.
4. Porzionato A, Rucinski M, Macchi V, Stecco C, Malendowicz LK, De Caro R. Spexin expression in normal rat tissues. J Histochem Cytochem. 2010;58(9):825–37.
5. Toll L, Khroyan TV, Sonmez K, Ozawa A, Lindberg I, McLaughlin JP, et al.Peptides derived from the prohormone proNPQ/spexin are potent central modulators of cardiovascular and renal function and nociception. FASEB J. 2012;26(2): 947–54.
6. Rucinski M, Porzionato A, Ziolkowska A, Szyszka M, Macchi V, De Caro R, et al.Expression of the spexin gene in the rat adrenal gland and evidences suggesting that spexin inhibits adrenocortical cell proliferation.Peptides. 2010;31(4): 676–82.
7. Hosseini E, Hjeidari M. Effect of Valsartan on the hormones of Pituitary-gonadal axis Performance in mature female Wistar Rats. J Birjand Univ Med Sci. 2013; 19 (4):409-15.
8. Kim DK, Yun S, Son GH, Hwang JI, Park CR, Kim JI, et al. Coevolution of the spexin/galanin/kisspeptin family: Spexin activates galanin receptor type II and III. Endocrinology. 2014; 155(5):1864-73.
9. Wong MK, Sze KH, Chen T, Cho CK, Law HC, Chu IK, et al. Goldfish spexin: solution structure and novel function as a satiety factor in feeding control.Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013;305(3):348-66.
10. Wu H, Lin F, Chen H, Liu J, Gao Y, Zhang X, et al. Ya-fish (Schizothorax prenanti) spexin: identification, tissue distribution and mRNA expression responses to periprandial and fasting.Fish Physiol Biochem. 2016;42(1):39-49.
11. Gu L, Ma Y, Gu M, Zhang Y, Yan Sh, Li N, Wang Y. Spexin peptide is expressed in human endocrine and epithelial tissues and reduced after glucose load in type 2 diabetes. Peptides. 2015;71(2):232–39.
12. Walewski JL, Ge F, Levin N, Schwartz GJ, Vasselli JR, Pomp A, et al. Spexin is a novel human peptide that reduces adipocyte uptake of long chain fatty acids and causes weight loss in rodents with diet-induced obesity. Obesity (Silver Spring). 2014;22(7):1643-52.
13. Dudek M, Kołodziejski PA, Pruszyńska-Oszmałek E, Sassek M, Ziarniak K, Nowak KW,et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. Neuropeptides. 2016;56(2):41-9.

14. Zhaohui Z, Jingzhu Z, Guipeng D, Xuesong W, Yuanming Z, Yinping W, et al. Role of neuropeptide Y in regulating hypothalamus-pituitary-gonad axis in the rats treated with electro-acupuncture. Neuropeptides. 2012;46(3):133-9.
15. Dudek M, KołodziejskiPA, Pruszyńska-Oszmałek E , M. Sassek M , Ziarniak K, Nowak KW , et al.Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. Neuropeptides.2016;56(2):41-49.
16. Akazome Y, Kanda S, Okubo K, Oka Y.Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain.Fish Biol.2010; 76(1): 161–82.
17. Grey CL, Grayfer L, Belosevic M, Chang JP. Ghrelin stimulation of gonadotropin (LH) release from goldfish pituitary cells: presence of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) and involvement of voltage-sensitive Ca2+ channels. Mol Cell Endocrinol. 2010;317(1-2):64-77.
18. Zhao E, Basak A, Wong AO, Ko W, Chen A, López GC, et al. The secretogranin II-derived peptide secretoneurin stimulates luteinizing hormone secretion from gonadotrophs. Endocrinology. 2009;150(5):2273-82.
19. Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J Fish Biol. 2010;76(1):129-60.
20. Moussavi M, Wlasichuk M, Chang JP, Habibi HR. Seasonal effect of GnIH on gonadotrope functions in the pituitary of goldfish. Mol Cell Endocrinol. 2012;350(1):53-60.
21. Hosseini SE, Bastampoor F, Sadeghi H. Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Parsley (Petroselinum Crispum) Leaf on the Testicle Tissue and Sexual Dynastic Cells of Adult Male Rats. JBUMS. 2014; 16 (9):36-42. [in Persian]
22. Hosseini E, Jahandideh M. Effects of the Alcoholic Extract of Ginger on Sex Hormone Serum Levels and Ovarian Follicles during Pregnancy and Lactation in the Adult Female Offspring of Rats. JBUMS. 2015; 17 (7):74-80. [in Persian]
23. José L W, Fengxia G, Harrison L, Nancy L, Gary JS, Joseph R. et al. Spexin Is a Novel Human Peptide that Reduces Adipocyte Uptake of Long Chain Fatty Acids and Causes Weight Loss in Rodents with Diet-Induced Obesity. Obesity.2014;22(7): 1643–1652.
24. Allaeian Z, Hemayatkhah Jahromi V, Jamali H, Kargar Jahromi H, Allaeian Jahromi AR. The effect of ecstasy (MDMA) on the number of ovary follicles and hormonal axis of pituitary-gonadal in immature Rats. J Fasa Univ Med Sci. 2013;2(4):287-97. [In Persian]
25. Li S, Liu Q, Xiao L, Chen H, Li G, Zhang Y, et al. Molecular cloning and functional characterization of spexin in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2016;196-197(5):85-91.
26. Liu Y, Li S, Qi X, Zhou W, Liu X, Lin H, et al. A novel neuropeptide in suppressing luteinizing hormone release in goldfish, Carassiusauratus.Mol Cel Endocrinol. 2013; 374(1-2):65-72.
27. Yun Liu, Shuisheng Li, Xing Qi, Wenyi Zhou, Xiaochun Liu, Haoran Lin, et al. A novel neuropeptide in suppressing luteinizing hormone release in goldfish, Carassius auratus Molecular and Cellular Endocrinology.2013;374(1-2):65-72.
28. Talebolhosseini M, Khazali H. Effects of intracerebroventricular injection of galanin on hypothalamic- pituitary- gonadal axis in male rat.Journal of Animal Environment.2016;8(1):35-44.
29. Aboutalebi F,Khazali H, Emami MA.Effect of High Energy Intake and Treatment with Galanin on Gonadotropin Levels in Female Goats.International Journal of Endocrinology and Metabolism.2011;9(1):271-75.
30. Kaminski T, Smolinska N, Nitkiewicz A, Przala J. Expression of orexin receptors 1 (OX1R) and 2 (OX2R) in the porcine hypothalamus during the oestrous cycle. J Physiol Pharmacol. 2010;61(3):363-71.
31. Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O.Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen Comp Endocrinol. 2010;165(3):438-55.
32. Porzionato A, Rucinski M, Macchi V, Stecco C, Ludwik K. Spexin expression in normal rat tissues. J Histochem Cytochem. 2010;58(9):825-37.
33. Lawrence T Taline V K, Kemal S, Akihiko O, Iris L, Jay P M,et al. Peptides derived from the prohormone proNPQ/spexin are potent central modulators of cardiovascular and renal function and nociception. FASEB J. 2012; 26(2): 947–54.
34. Barzegary Firouzabadi F, Javed A, Rezaei Zarchi S. In Vitro Evaluation of Influence of FSH Hormone on Growth and Maturation of Oocyte and Rat Preantral Follicular. JBUMS. 2010; 12 (4):27-34. [in Persian]
35. Martins RS, Pinto PI, Guerreiro PM, Zanuy S, Carrillo M, Canário AV. Novel galanin receptors in teleost fish: Identification, expression and regulation by sex steroids. Gen Comp Endocrinol. 2014;205(6):109-20.

Original Article

Effect of Spexin Neuropeptide on the Function of the Pituitary-gonadal Axis and Ovarian Follicles in Mature Female Rats

Sahragard A, Hosseini SE *

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: 21 Nov 2016 Accepted: 18 Apr 2017

Abstract

Background & Objectives: Neuropeptides are involved in various functions such as regulation of reproductive system function. With regards to the prevalence of reproductive disorders all over the world, this study is aimed at determining the effect of spexin on function of pituitary-gonadal axis in mature female rats.

Materials & Methods: In this experimental study, 40 mature female rats were used and divided into control, sham and three experimental groups receiving spexin at doses 5, 25 and 50µg/kg. All injections were administered intraperitoneally during 5 days. Finally, after phlebotomizing the animals for measuring FSH, LH, estradiol, progesterone and testosterone, their ovaries were removed and after tissue sectioning, the follicles were counted by using physical dissector technique. The obtained data were analyzed using ANOVA and Duncan tests through SPSS 18 software, considering the significance level of data at the level of $P<0.05$.

Results: The results showed that spexin causes significant increase in FSH, number of multi-layer follicles, antral and corpora lutea. As well, the results showed that spexin caused a significant decrease in progesterone, the number of atretic follicles and graphs ($P<0.01$). This research showed that at doses 25 and 50µg/kg, spexin caused a significant decrease in LH, at dose 25µg/kg caused a significant increase in testosterone ($P<0.05$) and at dose 50µg/kg caused a significant increase in the number of single-layer follicles ($P<0.01$) compared to the control group.

Conclusion: Spexin increases the number of multi-layer follicles and ovarian antral, by increasing the FSH serum level, nonetheless it causes the reduction of progesterone serum level, by decreasing the LH serum density.

Keywords: Spexin, estradiol, progesterone, testosterone, LH, FSH, ovarian follicles, Rats

***Corresponding author: Seyyed Ebrahim Hosseimi,** Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
Email: ebrahim.hossini@yahoo.com