مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر استرس بر ترشح گالانین در رتهای تغذیه شده با سطوح مختلف انرژی

معصومه معتمدی جویباری[1*]، همایون خزعلی[2]

۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

۲ استاد فیزیولوژی جانوری، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

چکیده

سابقه و هدف: گالانین یک هورمون دخیل در اشتها و بالانس انرژی میباشد به طوری که ، تزریق آن به هسته های درگیر در تغذیه، غذا خوردن را تحریک میکند. از طرف دیگر بالانس انرژی منفی با افزایش سطح اپینفرین و کورتیزول همراه است. هدف از این مطالعه بررسی اثر اپینفرین و کورتیزول بر ترشح گالانین در رتهای تغذیه شده توسط سطوح مختلف انرژی میباشد.

مواد و روش ها: ۴۵ عدد رت نر نژاد ویستار (۳۵۰-۳۰۰ گرم، ۱۵ رت در هر گروه) با سطوح انرژی ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ به مدت ۱۰ روز تغذیه شدند. سپس رتها به مدت ۴۸ ساعت تحت گرسنگی مطلق قرار گرفتند. حیوانات تحت عمل کانولاسیون در سرخرگ کاروتید به منظور تزریق و جمع آوری نمونه های خونی قرار گرفتند. رتها در هر گروه به ترتیب (3µg Ep/Kg BW) یا (3µg Cor/Kg BW) و مخلوط اپینفرین و کورتیزول دریافت کردند (0.1 mg in 1 ml PBS). نمونه های خونی در زمانهای قبل، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق جمع آوری و میزان گالانین و گلوکز پلاسما اندازه گیری شد.

یافته ها: تنها تزریق مخلوط اپینفرین و کورتیزول در رژیم ۵۰٪ و ۱۰۰٪ سطح گالانین را به طور معنی داری کاهش داد.($P>0.05$)

نتیجه گیری: نتایج نشان داد تزریق مخلوط اپینفرین و کورتیزول منجر به کاهش معنی دار گالانین در رژیم های ۵۰٪ و ۱۰۰٪ میشود در حالی که بر گالانین رتهای تغذیه شده با رژیم ۲۵٪ اثری ندارد. این مطالعه اثرات سینرژیسم اپینفرین و کورتیزول را بر هورمون گالانین نشان می دهد.

کلمات کلیدی: گالانین، کورتیزول، اپینفرین،استرس

مقدمه

گالانین نوروپپتیدی است که اولین بار توسط Tatemoto و همکارانش در سال ۱۹۸۳ از روده کوچک خوک استخراج شد(۱۲). مطالعات نشان داده است که تزریق گالانین به هسته های پاراونتریکولار، آمیگدال و پشتیمیانی غذاخوردن را تحریک میکند. بهعبارت دیگر، گالانین رفتارهای غذاخوردن را با مهار سیری تحریک میکند(۷). مطالعه ای نشان داده شده که ترشح گالانین در چاقی و بیاشتهایی عصبی مختل میشود(۱۷). همچنین گالانین درکنترل بالانس انرژی نقش دارد. اثرات متابولیک این پپتید شامل کاهش مصرف انرژی و کاهش فعال-سازی سمپاتیکی بافت چربی قهوهای است. باتوجه به این اثرات گالانین و اثراتش برترشح هورمون (هورمون رشد و انسولین)، میتوان گفت گالانین در تنظیم وزن بدن نقش دارد(۱۵). همه این مطالعات نشانگر نقش مهم گالانین در کنترل اشتها و حفظ بالانس انرژی است. از طرف دیگر تحقیقات نشان داده گرسنگی با افزایش سطح اپینفرین و کورتیزول همراه است (۱). پاسخ سازشی استرس توسط فاکتورهای ژنتیکی، محیطی و تکاملی

آدرس نویسنده مسئول : تهران، ولنجک، خوابگاه کوی خواهران، بلوک ۵

Email :motamedi.1363@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۶/۲
تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۰۱

Archive of SID

www.SID.ir

مشخص میشود که ویژگی های دفاع علیه عوامل استرسزای داخلی و خارجی را نشان میدهد ، استرس طولانی مدت یا حاد میتواند بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی مانند متابولیسم، تولید مثل، ایمنی، رشد و همچنین تکامل شخصیتی و رفتار را دچار نقص کند(۱۵). به عنوان یکی از پاسخ های سازشی به استرس، عملکردهای غیر حیاطی و انرژی بر به طور موقت در جهت حفظ انرژی و جهت دادن اکسیژن و مواد غذایی به CNS و ناحیه استرسی بدن مهار میشود. بخش مرکزی سیستم استرس با بخشی از سیستم عصبی مرکزی که اشتها و ذخیره انرژی را کنترل میکند در ارتباط است(۵،۶). استرس حاد معمولا با آنورکسیا همراه است و مصرف غذا را مهار میکند. CRH به شدت نورونهای POMC را در هسته آرک تحریک میکند که این نورونها از طریق ترشح آلفا-MSH سیگنالهای آنورکسیک را تحریک کرده و ترموژنز را افزایش میدهند. بنابراین، قابل پذیرفتن است که استرس حاد محور HPA را از طریق CRH فعال کرده و به این هدف این کار را میکند که به طور موقت عملکردهای انرژی خواه وابسته به غذا خوردن را مهار کرده و فعالیت محور HPA را ثابت نگه دارد(۶). تاکنون مطالعهای مبنی بر اثر اپینفری و کورتیزول به عنوان فاکتورهای اولیه استرس بر میزان گالانین پلاسما انجام نگرفته است اما از آنجایی که نشان داده شده تزریق اپینفرین میزان گرلین پلاسما را در زمان گرسنگی کاهش میدهد(۸). این احتمال وجود دارد که گالانین نیز به عنوان یکی دیگر از هورمونهای موثر در تغذیه تحت تاثیر تغییرات متابولیک و هورمونی ناشی از گرسنگی مانند هورمونهای استرسی قرار بگیرد. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر تزریق هورمونهای استرسی (کورتیزول و اپینفرین) روی گالانین به عنوان یک فاکتور قوی اشتها در موشهای گرسنهای که با رژیمهای متفاوت غذایی از لحاظ سطح انرژی تغذیه شده اند میباشد.

مواد و روش ها

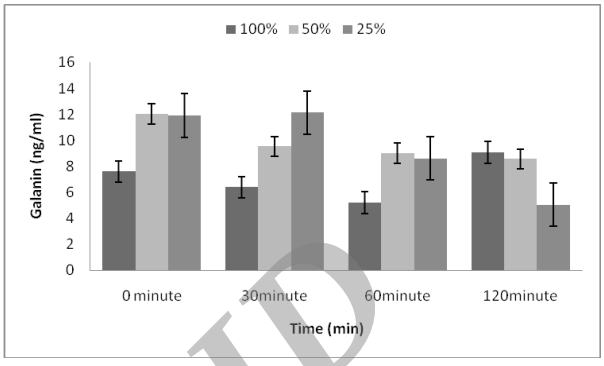
در این مطالعه از ۴۵عدد رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم استفاده شده است. حیوانات در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در اتاق حیوانات دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران نگهداری شدند. در این مطالعه از محلول تزریقی اپینفرین، کورتیزول و کیت مخصوص سنجش هورمون گالانین(شرکت تابشیار نور) استفاده شده است. ۴۵ عدد رت نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. حیوانات در گروه ۱ با ۲۵٪، در گروه ۲ با ۵۰٪ و در گروه ۳ با ۱۰۰٪ انرژی به مدت ۱۰ روز تغذیه شدند. نحوهی تعیین رژیم مورد نظر بر اساس میانگین مصرف حیوان به طور نرمال در روز ضرب در درصد رژیم غذایی بوده است. آب به صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار داشت. بعد از ۱۰ روز غذا از جلوی حیوانات به مدت ۴۸ ساعت برداشته شد. پس از ۴۸ ساعت گرسنگی مطلق، (ساعت ۸ صبح) حیوانات توسط تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین و زایلزین بیهوش شده و تحت جراحی کانولاسیون قرار گرفته و یک عدد کانول پلاستیکی در سرخرگ کاروتید چپ حیوان به منظور تزریق و خونگیری قرار داده شد. رت های هر گروه به سه دسته تقسیم شده و به هر دسته بهترتیب (3µg Ep/ Kg BW یا (3 µg Cor/Kg BW و مخلوط این دو درون رگ کاروتید تزریق شد (۰/۱ میلیگرم در ۱ میلی لیتر PBS). نمونههای خونی قبل از تزریق، و در زمانهای ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق از رگ کاروتید جمعآوری شد و بلافاصله به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسمای نمونه های خونی جدا شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غلظت پلاسمایی گالانین با استفاده از روش رادیوایمینواسی (RIA) و با استفاده از آنتی- ژن ارکسین موشی (سه تکرار برای هر نمونه) در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران اندازهگیری شد. اینتراسی و اینتراسی گالانین به ترتیب ۴٪ و ۳٪ بود. میزان گلوکز نمونههای خونی توسط دستگاه گلوکومتر اندازهگیری شد. کلیه دادهها برای مقایسه میانگین غلظت هورمون گالانین و گلوکز قبل و بعد از تزریق با کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری آنووای یک طرفه و دوطرفه مکرر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مشاهده معنی دار بودن تغییرات از پسآزمون(Post Hoc) بنفرونی(Bonferroni) استفاده شد. داده ها به صورت Mean±SEM بیان شدهاند و مقادیر ($P<0.05$) معنادار تلقی گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

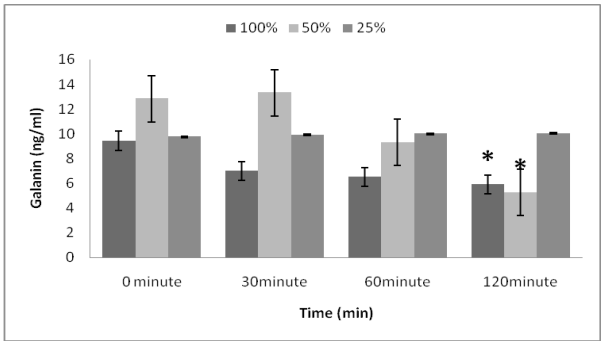
یافته ها

همانطور که در شکل۱ می بینید، میانگین سطح گالانین پلاسما بعد از تزریق کورتیزول فقط در گروه ۵۰٪ کاهش معنی داری را نشان داد($P>0.05$).



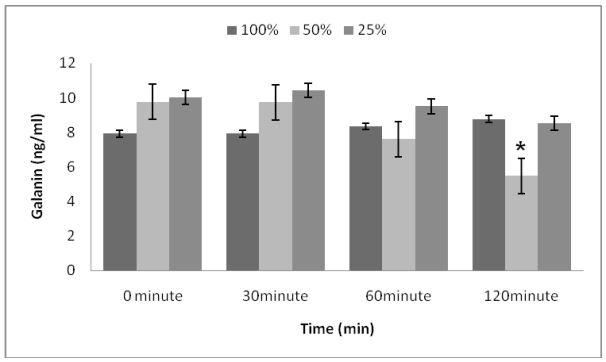
شکل ۱- اثر تزریق درون رگی کورتیزول (0.3 µg/g BW) برمیانگین غلظت پلاسمایی گالانین قبل (زمان ۰) و۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیمهای ۱۰۰، ۵۰ و۲۵ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنیدار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل (زمان صفر) را نشان میدهد.

با توجه به شکل۲ ، میانگین سطح گالانین پلاسما در هیچ یک از گروهها تغییر معنیداری نشان نداد($P>0.05$).



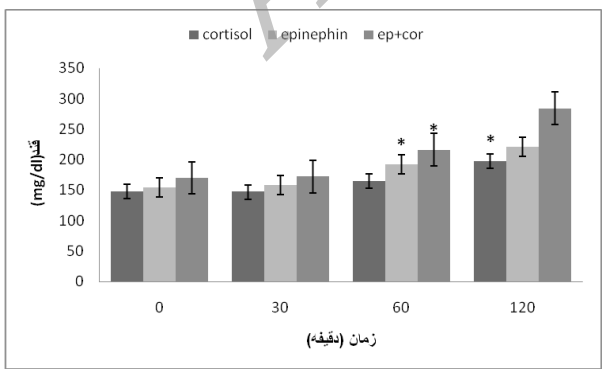
شکل ۲- اثر تزریق درون رگی اپینفرین (0.3 µg/g BW) برمیانگین غلظت پلاسمایی گالانین قبل (زمان ۰) و۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیمهای ۱۰۰، ۵۰ و۲۵ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنیدار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل (زمان صفر) را نشان می-دهد.

در شکل ۳ اثر تزریق مخلوط اپینفرین و کورتیزول روی میانگین سطح گالانین پلاسما در سه گروه با رژیمهای ۲۵٪ و۵۰٪ و۱۰۰٪ نشان داده شده است. اثر کاهشی مخلوط اپینفرین و کورتیزول روی گالانین در رژیم ۱۰۰٪ و ۵۰٪ معنی دار است ($P<0.05$).



شکل ۳- اثر تزریق درون رگی مخلوط اپینفرین و کورتیزول0.3 µg/g (BW) برمیانگین غلظت پلاسمایی گالانین قبل (زمان ۰) و۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیمهای ۱۰۰، ۵۰ و۲۵ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنیدار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل (زمان صفر) را نشان میدهد.

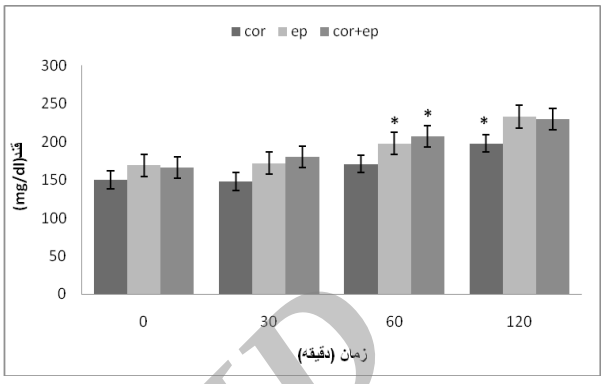
شکل ۴ و۵ به ترتیب اثر تزریق هورمونهای استرسی روی گلوکز، در رژیمهای ۱۰۰٪ و ۵۰٪ انرژی را نشان میدهد. در همه موارد اختلاف معناداری بین قبل از تزریق و ۶۰ دقیقه بعد از تزریق مشاهده میشود ($P<0.05$). اما اثر اپینفرین روی گلوکز خون به مراتب بیشتر از اثر کورتیزول است. و همینطور اثر افزایشی اپینفرین و کورتیزول قابل مشاهده میباشد ($P<0.05$). همانطور که در شکل ۶ میبینید هورمونهای استرسی در رژیم ۲۵٪ روی گلوکز اثر معناداری ندارند($P>0.05$).



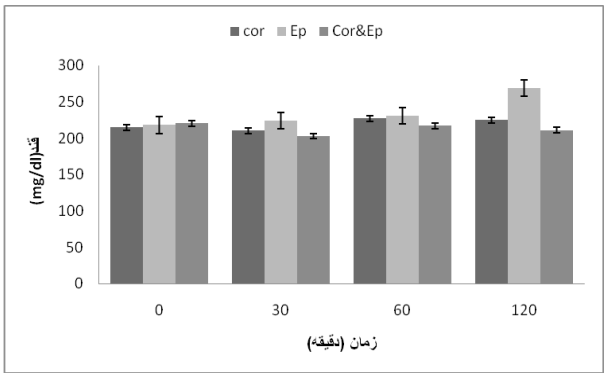
شکل ۴- اثر تزریق درون رگی کورتیزول (Cor)، اپینفرین (Ep) و مخلوط اپینفرین و کورتیزول (Cor&Ep)(3 µg/Kg BW) بر میانگین غلظت

Archive of SID
www.SID.ir

پلاسمایی گلوکز خون قبل (زمان ۰) و ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیم ۱۰۰ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنی دار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به کنترل (زمان صفر) را نشان میدهد.



شکل ۵- اثر تزریق درون رگی کورتیزول (Cor)، اپینفرین (Ep) و مخلوط اپینفرین و کورتیزول (Cor&Ep)(3 µg/Kg BW) بر میانگین غلظت پلاسمایی گلوکز خون قبل (زمان ۰) و ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیم ۵۰ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنیدار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل (زمان صفر) را نشان میدهد.



شکل ۶- اثر تزریق درون رگی کورتیزول (Cor)، اپینفرین (Ep) و مخلوط اپینفرین و کورتیزول (Cor&Ep)(3 µg/Kg BW) بر میانگین غلظت پلاسمایی گلوکز خون قبل (زمان ۰) و ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق در حیواناتی که به مدت ۱۰ روز تحت رژیم ۲۵ درصد انرژی بودند. مقادیر به صورت Mean±SEM بیان شدهاند. علامت ستاره معنیدار بودن در سطح $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل (زمان صفر) را نشان میدهد.

بحث:

مطالعات قبلی ثابت کرد اپینفرین میتواند موجب افزایش غلظت قند خون شود(۹). نتایج حاصل از مطالعه، نتایج مطالعات قبلی را تأیید میکند به طوری که تزریق اپینفرین باعث افزایش چشمگیر قند خون در رتهایی که تحت رژیم ۱۰۰ و ۵۰ درصد قرار داشتند شد. نتایج حاصل از این آزمایش برای اولین بار نشان داد اپینفرین میتواند غلظت گالانین پلاسما را در رتهایی که تحت رژیم ۵۰ و ۱۰۰ درصد انرژی قرار داشتهاند کاهش دهد اما این اثر کاهشی در رژیم ۲۵ درصد دیده نشد. همچنین کورتیزول در این مورد در رژیم ۵۰ درصد باعث کاهش معنی-دار گالانین شد. مطالعات زیادی نشان دادند که عبور لپتین از سد خونی- مغزی در پاسخ به اپینفرین افزایش مییابد(۱). از طرف دیگر مطالعات نشان داده تزریق مرکزی لپتین، دریافت غذای القاء شده توسط گالانین را کاهش میدهد (۱۰). همچنین تزریق درون بطنی لپتین بیان ژن گالانین را در هیپوتالاموس کاهش داده که با کاهش دریافت غذا و وزن بدن همراه است (۱۰). وجود رسپتورهای لپتین در سلولهای تولید کنندهی گالانین و نوروپپتیدY (NPY) پیشنهاد میکند که لپتین یک اثر مستقیم روی این نورونها میگذارد(۱۱،۱۴). بنابراین میتوان اینطور نتیجه گیری کرد که ممکن است لپتین در پاسخ به اپینفرین بر سلولهای تولید کننده گالانین اثر گذاشته و موجب کاهش غلظت پلاسمایی گلانین شود. از طرف دیگر انسولین میتواند عامل متابولیک دیگر در توجیه کاهش گالانین باشد. چرا که انسولین هم میتواند به طور مستقیم تحت تأثیر اپینفرین افزایش یابد و هم به طور غیرمستقیم در پاسخ به افزایش قند خون افزایش یابد (۵). از آنجایی که مطالعات نشان دادند تزریق درون بطنی انسولین، میتواند بیان ژن گالانین و NPY را در نواحی مختلف هیپوتالاموس کاهش دهد (۳). در حالی که بر بیان گالانین در نقاط خارج از هیپوتالاموس اثری ندارد. با توجه به اینکه مطالعات نشان میدهند انسولین و گالانین به طور مستقیم بر هم تاثیر گذار هستند،(۲،۱۸) میتوان نتیجه گرفت ، در این مورد انسولین به طور مرکزی و مستقیم فعالیت ژن گالانین را کم میکند. به هر حال با توجه به نتایج بالا، افزایش انسولین در این شرایط میتواند به عنوان یک عامل متابولیک در پاسخ کاهشی گالانین موثر باشد. در این مطالعه اثر اپینفرین و کورتیزول بر میزان گالانین پلاسما تحت کنترل شرایط بالانس انرژی بوده به طوری که در رتهایی که تحت رژیم ۲۵٪ قرار

Archive of SID
www.SID.ir

داشتند این اثر کاهشی گالانین مشاهده نشده است. این عدم تاثیر میتواند بدلیل اختلال در بالانس هورمونی در شرایط بسیار سخت باشد به طوری که نشان داده شده سه هفته رژیم سخت منجر به اختلال عملکرد مسیر HPA به همراه افزایش در سطح کورتیزول شد که این افزایش کورتیزول حتی با دوز ۱،۵ میلی-گرم دگزامتازون هم کاهش پیدا نکرد. همچنین پاسخ TSH به TRH بلاک شده بود (۱). بنابراین اختلال در مسیر HPA در شرایط گرسنگی سخت خود میتواند توجیه کننده عدم پاسخ گالانین به اپینفرین و کورتیزول در رتهایی که تحت رژیم ۲۵٪ قرار گرفتند باشد.

داده های حاصل از این تحقیق یافتههای قبلی را مبنی بر نقش گالانین در حفظ بالانس انرژی تایید میکند، و همچنین نشان میدهد که استرس میزان گالانین پلاسما را کاهش میدهد. اما براساس این یافته ها، اثر استرس بر تغذیه به وضعیت متابولیکی وابسته بوده، چرا هورمونهای استرسی بر میزان گالانین پلاسما در زمانی که رتها در شرایط گرسنگی بسیار شدید بودند بی تاثیر بود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Banks WA, Burney BO, Robisnon SM.. Effects of triglyceries, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. Peptides, 2008; 29:2061-2065.
2. Fang P, Ping B, Shi M, Mei Y, Zhang Z. Circulating ganalin levels are increased in patients with gestational iabetes mellitus. Clin Biochem, 2012; in press.
3. Fraley GS, Scarlett JM, Shimada I, Teklemichael DN, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. Effects of diabetes and insulin on the expression of galanin-like peptide in the hypothalamus of the rat. Diabetes, 2004; 53:1237-1242.
4. Fichter MM, Pirke KM, Holsboer F. Weight loss caused neuroendocrine disturbances: experimental study in healthy starving subjects. Psychia res, 1986; 17: 61-72.
5. Karla SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Hovarth TL, Karla PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocrine Review,1999; 20: 68-100.
6. Kyrous I, Chrousos GP, Tsigos C. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. Ann NY Academ Sci, 2006; 1083, 77-110.
7. Mechenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. Cell Mol Life Sci, 2008; 12, 1826-1835.
8. Motamedi Joibari M, Khazali H. Effect of epinephrine and cortisol on fasting-induced ghrelin secretion in male rats fed different levels of their energy requirement. Physiol Pharmacol, 2010; 14, 165-173.
9. Oda S, Tsuda T, Sasaki Y. Adrenergic effects on pancreatic glucagon and insulin secretions in rabbits. Tohoku J Agri Res, 1994; 45, 29-35.
10. Sahu A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), Neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. Endocrinol, 1998; 139, 795-798.

11. Sahu A. Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. Endocrinol, 1998; 139:39-47.

12. Saito E, Kaiya H , Takagi T, Izumi Y, Denbow DM, Kangawa K, Frurse M. Chicken ghrelin and growth hormone-releasing peptide-2 inhibit food intake of neonatal chicks. Europ J Pharmacol, 2002; 453: 75-79.
13. Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, Mcdonald TJ, Mutt V. Galanin- a novel biologically active peptide from porcine intestine. FEBS Letter, 1983;164: 124-128.

14. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. Endocrinol, 2004; 89: 2963-2972.
15. Tsiqos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis neuroendocrine factors and stress. J Psychol Res, 2002;53: 865-871.
16. Wang J, Akabayashi A, Yu HJ, Dourmashkin J, Alexander JT, Silva I, Lighter J, Leibowitz SF. Hypothalamic galanin: control by signals of fat metabolism. Brain Res, 1998; 804:7-20.

17. Yuan CS, Dey L, Xie JT, Aung HH. Gastric effects of galanin and its interaction with leptin on brainstem neuronal activity.JPET, 2002;301: 488-493.

18. Zhang Z, Sheng S, Guo L, Guangzhi L, Zhang L, Zhang L, Mingyi S, Bo P, Zhu Y. Intracerebroventricular administration of galanin antagonist sustains insulin resistance in adipocytes of type 2 diabetic trained rats. Mol Cell Endocrinol, 2012;361: 213-218.

Archive of SID

www.SID.ir