

بر هم کنش میزان اخذ غذا و بیان ژن گیرنده نوروپپتید Y₁ تحت تاثیر افزایش سن در موشهای صحرایی

محمدرضا خوانساری^۱، نگار پناهی^{۱*}، سعید حسین زاده^۲، مرتضی زنده دل^۳

چکیده

دریافت غذا و مصرف انرژی با افزایش سن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. هدف اصلی این تحقیق بر مطالعه افزایش سن و تغییرات مصرف غذا است. در این تحقیق در مورد تغییرات سنی در بیان ژن گیرنده نوروپپتید Y₁ (NPY_{1R}) در هیپوتالاموس را بررسی کردیم که بیان آن با افزایش سن در هیپوتالاموس تغییر می‌کند. میزان مصرف غذا، دریافت انرژی در موش‌های نر جوان (سن ۲۰-۲۵ هفته) و مسن (سن ۱۲۰-۱۲۵ هفته) بررسی گردید و سپس نمونه‌های هیپوتالاموس مغز از سه گروه موش‌های نر گروه کنترل ۲۰ هفته و گروه جوان ۲۵ هفته و گروه مسن ۱۲۵ هفته جدا شد و با استفاده از تکنیک روش ریل تایم پی سی آر (Realtime PCR) میزان بیان ژن NPY_{1R} بررسی گردید. ما مشاهده کردیم که میزان مصرف غذا و بیان ژن NPY_{1R} به طور قابل توجهی با افزایش سن تغییر می‌کند. اگرچه مصرف غذا در موش‌های پیر کمتر از موش‌های جوان بود، اما دریافتیم که میزان بیان ژن NPY_{1R}، که باعث افزایش مصرف غذا می‌شود، در موش‌های مسن افزایش می‌یابد. در نتیجه، این نشان می‌دهد که الگوی بیان ژن NPY_{1R} در هیپوتالاموس برای مصرف غذا با افزایش سن تغییر می‌یابد.

واژگان کلیدی: پیری، نوروپپتید Y₁ بیان ژن، موش صحرایی، هیپوتالاموس

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۱

مقدمه

سلامت افراد مسن به دلیل پیری تدریجی جمعیت در اکثر کشورهای توسعه یافته به یک موضوع اجتماعی مهم تبدیل شده است. یک رژیم غذایی متعادل و مغذی برای حفظ سلامتی ضروری است. به عنوان مثال، موش‌های پیر (بیش از ۱۰۰ هفته) تغییرات قابل توجهی در حساسیت طعمی خود نسبت به مزه‌های تلخ و شور نشان دادند (۱).

با این حال، مکانیسم‌های مولکولی زیربنای این پدیده نامشخص است. به طور کلی، مغز با افزایش سن کوچک می‌شود و تغییرات در همه سطوح، از مواد شیمیایی گرفته تا مورفولوژی، رخ می‌دهد (۲). پیشنهاد شده است که تغییرات مربوط به سن در عملکرد چشایی با تغییرات در مدارهای عصبی مرتبط است (۳). بنابراین، عملکردهای مغز را می‌توان برای روشن کردن مکانیسم‌های مولکولی زمینه ساز تغییرات وابسته به پیری در حساسیت طعم هدف قرار داد (۳).

هر منطقه عملکردهای متفاوتی در مغز دارد. هیپوتالاموس به عنوان منطقه مرکزی برای تنظیم تغذیه شناخته می‌شود (۴). برخی از نواحی عصبی مرکزی در مغز به عنوان گره‌های حیاتی در هموستاز انرژی شناخته می‌شوند (۵). به طور خاص، ناحیه هسته کمانی هیپوتالاموس (ARC) حاوی دو پپتید عصبی است که تعادل انرژی را با عملکردهای متضاد کنترل می‌کنند: پپتید/نوروپپتید-Y مرتبط با آگوتی (AgRP/NPY) سیگنال‌های گرسنگی و تحریک دریافت غذا و پرو-اپیوملانوکورتین (POMC) سیگنال سیری می‌دهد و مصرف غذا را کاهش می‌دهد (۵). این سطوح پپتید عصبی به وضعیت انرژی واکنش نشان می‌دهند و سیگنال‌های گرلین، لپتین و انسولین محیطی را برای تنظیم تغذیه و مصرف انرژی تنظیم می‌کنند. منبع اصلی NPY در هیپوتالاموس از نورون‌های تخصصی در ARC است (۶).

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران n.panahi@srbiau.ac.ir

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

جمعیت مورد مطالعه شامل موش های صحرایی نر نژاد ویستار بود. حیوانات در مرکز مراقبت از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات نگهداری شدند و به طور آزاد به غذای استاندارد آزمایشگاهی و آب مقطر دسترسی داشتند. دما و رطوبت اطراف به ترتیب در ۲۲-۲۵ درجه سانتیگراد و ۵۰-۵۵ درصد با چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعت در ۱۲ ساعت حفظ شد. موش ها را به دو گروه سنی تقسیم شد: گروه جوان ۲۰-۲۵ هفته و گروه مسن ۱۲۵-۱۲۰ هفته. همه آزمایش ها مطابق با پروتکل های تایید شده توسط کمیته مراقبت از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (شماره تایید: IR. IAU. 1397. REC. 1397. 12) انجام شد. بخش هیپوتالاموس مغز از تمام حیوانات بلافاصله قبل از انجماد در نیتروژن مایع جمع آوری شد. نمونه ها در دمای منهای ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا مورد استفاده قرار گیرند.

جداسازی RNA

طبق دستورالعمل سازنده، RNA کل از قسمت هیپوتالاموس مغز با استفاده از یک کیت کوچک RNA جدا شد. غلظت نهایی RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر ND-1000، Nanodrop® تعیین شد. خلوص RNA با نسبت جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تایید شد (۸).

سنتز cDNA

حدود ۱ میکروگرم از کل RNA برای سنتز cDNA رشته اول با استفاده از کیت سنتز cDNA رشته اول Thermo Scientific RevertAid، k1622 استفاده شد (۸).

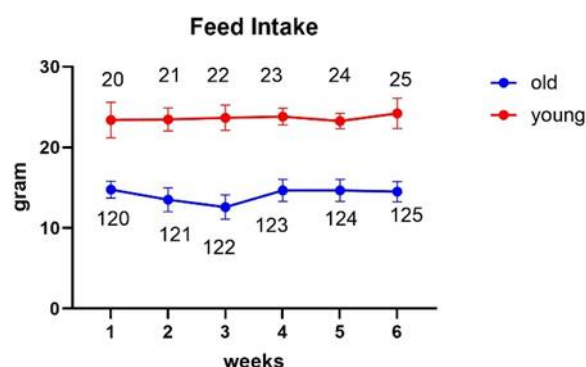
ارزیابی سطح بیان نسبی ژن NPY1 با استفاده از روش qRT-PCR

PCR بلادرنگ با استفاده از qPCR Green Master با سیستم Rotor-Gene Q (QIAGEN) پایین Rox برای تعیین کمیت mRNA NPY1R و بتااکتین انجام شد. جزئیات توالی

خارج از هیپوتالاموس، نورون های بیان کننده NPY در سراسر سیستم عصبی مرکزی یافت می شوند، به ویژه سطوح بالایی از بیان NPY در ساقه مغز و نواحی هیپوکامپ یافت شده است (۶). نورون های ARC، سیگنالهایی را به نورون های هیپوتالاموس از جمله PVN، VMN، LHA و DMN ارسال می کنند. بنابراین، اعمال NPY در سراسر هیپوتالاموس گسترش می یابد و بر نورون های این ناحیه تأثیر می گذارد (۶). NPY فعالیت عصبی PVN را با مکانیسم های پیش سیناپسی و پس سیناپسی تعدیل میکند. در حالت اول، NPY آزاد شدن GABA را از جمعیت پایانه های GABAergic مهار می کند (۷). جالب توجه است که به نظر می رسد پاسخ پس سیناپسی به طور کامل توسط گیرنده های Y1 واسطه می شود (۸). در سال های گذشته مشخص شده است که مغز نقش مهمی در ایجاد چاقی و بیماری های مرتبط با چاقی دارد. بیشتر شواهد به اختلال در مصرف غذا و مصرف انرژی به دلیل التهاب و گلیوز در هیپوتالاموس، ناشی از رژیم غذایی اشاره دارد (۹).

اخیراً گزارش شده است که فعال سازی انتخابی نورون های پروتئین مرتبط با آگوتی (AgRP) در هیپوتالاموس حساسیت چشایی را تغییر می دهد (۱۰). بنابراین، بررسی تغییر در هیپوتالاموس به دلیل افزایش سن ممکن است برای آشکار کردن علت تغییرات مربوط به سن در عملکرد چشایی مفید باشد. در این مطالعه، با استفاده از نمونه های هیپوتالاموس به دست آمده از موش های پیر و جوان برای بررسی تغییرات بیان ژن گیرنده NPY₁ در هیپوتالاموس و میزان دریافت غذا به دلیل افزایش سن انجام شد.

مواد و روش کار حیوانات



شکل ۳

تغییر در وزن بدن و مصرف غذا. (الف) تغییرات وزن بدن در طول ۶ هفته قبل از نمونه برداری (۲۰-۲۵ هفته برای موش های جوان و ۱۲۰-۱۲۵ هفته برای موش های پیر). (ب) تغییر در مصرف هفتگی غذا (۲۰-۲۵ هفته برای موش های جوان و ۱۲۰-۱۲۵ هفته برای موش های پیر).

میزان بیان ژن NPY1R

مصرف غذای موش های پیر کمتر از موش های جوان بود (ب)، در میان ژن های تقویت کننده مصرف غذا نوروپپتید Y (گیرنده Y1) به دلیل افزایش سن بصورت معنی داری افزایش یافت ($P < 0.0001$). میزان تغییرات بیان ژن در ۲۰، ۲۵ و ۱۲۵ هفته مورد بررسی قرار گرفته است که این یافته نشان می دهد که الگوی بیان ژن NPY1R در هیپوتالاموس برای دریافت غذا افزایش می یابد (شکل ج).

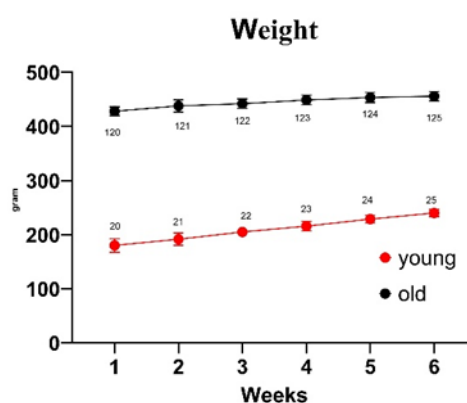
پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی بیان ژن در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. تقویت PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از مخلوط اصلی qRT-PCR انجام شد (۸).

هر واکنش شامل ۰/۶ میلی مولار از هر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر-qRT-PCR Green Master Mix و ۱ میکرولیتر آماده سازی cDNA بود. سپس، نمونه ها در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل تقویت (۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه) انکوبه شدند. برای هر مجموعه، واکنش کنترل با حذف تمام مراحل بدون cDNA الگو انجام می شود. علاوه بر این، mRNA بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی برای ارزیابی سطح بیان نسبی ژن NPY1R استفاده می شود. مقادیر نسبی رونوشت ها $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ثبت می شوند. نتایج نهایی نشان داد نسبی سطوح فشار تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای تأیید بیشتر ویژگی آغازگرها انجام می شود (۸).

نتایج

تغییر در وزن بدن و مصرف غذا

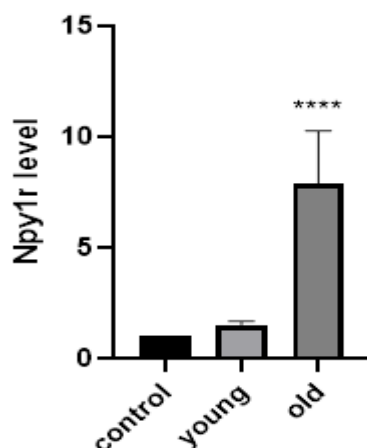
شکل ۱ وزن بدن و غذای مصرفی را برای ۶ هفته قبل از نمونه گیری نشان می دهد. وزن بدن موش های پیر به طور قابل توجهی بیشتر از موش های جوان در طول دوره اندازه گیری بود (شکل الف). با این حال، دریافت غذا نسبت به وزن بدن موش های پیر کمتر از موش های جوان بود (شکل ب). بنابراین، موش های مسن سنگین تر از موش های جوان بودند، اما غذای کمتری مصرف کردند.



مصرف غذا و متابولیسم انرژی تحت تأثیر افزایش سن قرار می گیرد. از آنجایی که مرکز تغذیه در هیپوتالاموس قرار دارد، یک ناحیه مهم برای بررسی مکانیسم های تغییرات مرتبط با سن در رفتار غذایی و متابولیسم است. علاوه بر این، طعم و مزه عامل مهمی در مصرف مواد غذایی است. حساسیت چشایی با افزایش سن تغییر می کند (۱، ۲، ۴). با این حال، مکانیسم این تغییرات به خوبی درک نشده است. اخیراً گزارش شده است که فعال شدن نورون های AgRP در هیپوتالاموس بر حساسیت به طعم های تلخ و شیرین تأثیر می گذارد (۱۰)، که نشان می دهد فعالیت شبکه ای از نورون های هیپوتالاموس که اشتها را کنترل می کند نیز ممکن است بر حساسیت طعم تأثیر بگذارد (۳). بنابراین، برای به دست آوردن درک درستی از مکانیسم های اولیه تغییرات مربوط به سن در حساسیت طعم، تغییرات مربوط به سن در بیان ژن NPY در هیپوتالاموس بررسی کردیم (۳).

یافته های ماساتاکا و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که ۱۱ ژن طبقه بندی شده به عنوان مسیرهای سیگنالینگ نوروپپتیدی در بین موش های جوان و پیر هستند که از این میان، *Npy*، *AgRP* و *Pmch* که مصرف غذا را تحریک می کنند و سطح بیان آنها در موش های پیر افزایش یافت (۱). علاوه بر این، سطح بیان سایر ژن های مرتبط با مصرف غذا، مانند فاکتور رشد شبه انسولین ۲ (*Igf2*) و گیرنده دوپامین ۱ (*Drd1*) و ۲ (*Drd2*)، در موش های مسن کاهش یافت (۱). مشخص است که تجویز مرکزی *Igf2* می تواند مصرف غذا را کاهش دهد (۱۲). همچنین پیشنهاد شده است که فعال شدن *Drd1* و *Drd2* در هیپوتالاموس جانبی رفتار تغذیه را سرکوب می کند (۱۳). این یافته ها نشان داد که موش های پیر دارای الگوهای بیان ژنی هستند که مصرف غذا را تقویت می کند. با این حال، از آنجایی که موش های پیر نسبت به موش های جوان غذای کمتری مصرف می کنند

NPY1R Gene expression changes



شکل (ج) الگوی بیان ژن NPY1R: $F=137.8$, $Df=1$, $Df=2$, $P<0.0001$ گروه جوان سن ۲۵ هفته و گروه پیر ۱۲۵ هفته هستند.

بحث

پیری فرآیندی پیچیده است که با کاهش تدریجی عملکرد مغزی، زوال فیزیولوژیکی و رفتاری مشخص می شود. پیری مغز عملکردهای بیولوژیکی و فیزیوشیمیایی نورون ها را تغییر می دهد و منجر به از دست دادن حافظه، تغییرات رفتاری، کاهش توانایی های شناختی، زوال عقل و تضعیف پاسخ های ایمنی می شود (۱). اخیراً Hajdarovic و همکاران با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی یابی تک هسته ای، اثرات پیری را بر هیپوتالاموس موش بر اساس نوع سلول، از جمله نورون ها، آستروسیت ها و اولیگودندروسیت ها گزارش کرد (۲). نویسندگان پیشنهاد کردند که بیان ژن با افزایش سن در اکثر انواع سلولها متغیرتر می شود، که ممکن است عاملی در اختلال عملکرد سلولی در هیپوتالاموس موش مسن باشد. بنابراین، برای درک بهتر مکانیسم پیری مغز، جمع آوری طیف گسترده ای از اطلاعات در مورد تغییرات بیان ژن که با افزایش سن رخ می دهد، ضروری است (۱۱).

حساسیت طعم شیرین در موش های مسن مشاهده نشد، که نشان می دهد عواملی غیر از AgRP نیز ممکن است در تغییرات مربوط به سن در حساسیت مزه دخیل باشند. یافته های ماساتاکا و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که بیان ۱۱ ژن شناسایی شده با افزایش سن در هیپوتالاموس تغییر می کند (۱).

یافته های ما نشان داد که مصرف غذای موش های پیر کمتر از موش های جوان بود و در حالیکه ژن های مصرف غذای NPY به دلیل افزایش سن افزایش یافت. این یافته نشان می دهد که الگوی بیان ژن NPY در هیپوتالاموس برای دریافت غذا با افزایش سن افزایش می یابد.

فهرست منابع

1. Narukawa M, Saito Y, Kasahara Y, Asakura T, Misaka T. Changes in gene expression due to aging in the hypothalamus of mice. *NeuroReport*. 2024;35(15):987-91.
2. Hajdarovic KH, Yu D, Hassell L-A, Evans SA, Packer S, Neretti N, Webb AE. Single-cell analysis of the aging female mouse hypothalamus. *Nature aging*. 2022;2(7):662-78.
3. Narukawa M, Kurokawa A, Kohta R, Misaka T. Participation of the peripheral taste system in aging-dependent changes in taste sensitivity. *Neuroscience*. 2017;358:249-60.
4. Iannilli E, Broy F, Kunz S, Hummel T. Age-related changes of gustatory function depend on alteration of neuronal circuits. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(10):1927-36.
5. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the society for*

رابطه متناقضی بین رفتار خوردن و بیان ژن وجود داشت. تفاوت معنی داری در بیان فاکتورهای پپتیدرژیک که باعث افزایش یا سرکوب مصرف غذا می شوند، مانند پرو-اپیوملانوکورتین آلفا (POMC)، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (Bdnf)، هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH) و گالانین (Gal) بین موش های جوان و پیر وجود نداشت (۱۴).

همانطور که قبلاً ذکر شد، عملکرد متابولیک با افزایش سن کاهش می یابد. پروتئین اصلی ادرار ۱ (Mup1) که عضوی از خانواده لیپوکالین است و بیان آن در موش های مسن کاهش یافته است به عنوان یک تنظیم کننده گلوکونئوزن و لیپوزن در کبد عمل می کند (۱۵) و با ارتقاء عملکرد میتوکندری، مصرف انرژی و تحمل گلوکز را بهبود می بخشد (۱۶). این نتایج با این واقعیت سازگار است که متابولیسم با افزایش سن کاهش می یابد. سطح تستوسترون بر دریافت غذای رژیمی تأثیر می گذارد (۱۷). تفاوت معنی داری در سطح تستوسترون سرم بین موش های پیر و جوان یافت نشد. همچنین مشخص است که سطح لپتین بر غلظت تستوسترون تأثیر می گذارد (۱۷). هنگامی که سطح لپتین خون در موش های پیر و جوان اندازه گیری شد، متوجه شدند که تفاوت معنی داری در سطح لپتین سرم وجود ندارد (۱۷).

بیان AgRP در موش های مسن افزایش یافت مشخص شده است که حساسیت طعم تلخ در موش های پیر کاهش می یابد (۱۰). در مقابل، کاهش حساسیت به طعم تلخ در موش های دارای نورون های AgRP فعال شده مشاهده شده است (۱۰). بنابراین، تغییرات در حساسیت طعم تلخ مشاهده شده در موش های پیر ممکن است تا حدی با اثرات نورون AgRP توضیح داده شود. علاوه بر این، فعال شدن نورون های AgRP نیز منجر به افزایش حساسیت طعم شیرین می شود (۳). هیچ تغییر قابل توجهی در

- experimental biology and Medicine. 1951;77(2):323-5.
6. Mehay D, Silberman Y, Arnold AC. The arcuate nucleus of the hypothalamus and metabolic regulation: an emerging role for renin-angiotensin pathways. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(13):7050.
7. Hao S, Yang Y, Helmy M, Wang H. Neural regulation of feeding behavior. *Neural Circuits of Innate Behaviors*. 2020:23-33.
8. Khansari MR, Panahi N, Hosseinzadeh S, Zendehdel M. Effect of cannabinoid-serotonin interactions in the regulation of neuropeptide Y1 receptors expression in rats: the role of CB1 and 5-HT2C receptor. *Comparative Clinical Pathology*. 2020;29(2):561-71.
9. Oberto A, Bertocchi I, Longo A, Bonzano S, Paterlini S, Meda C, et al. Hypothalamic NPY-Y1R interacts with gonadal hormones in protecting female mice against obesity and neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):6351.
10. Deem JD, Faber CL, Morton GJ. AgRP neurons: Regulators of feeding, energy expenditure, and behavior. *The FEBS journal*. 2022;289(8):2362-81.
11. Narukawa M, Kamiyoshihara A, Izu H, Fujii T, Matsubara K, Misaka T. Efficacy of long-term feeding of α -glycerophosphocholine for aging-related phenomena in old mice. *Gerontology*. 2020;66: 375-385
12. Mercer RE, Chee MJ, Colmers WF. The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2011;32(4):398-415.
13. Yonemochi N, Ardianto C, Yang L, Yamamoto S, Ueda D, Kamei J, et al. Dopaminergic mechanisms in the lateral hypothalamus regulate feeding behavior in association with neuropeptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;519(3):547-52.
14. Sahu A. Minireview: a hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology*. 2004;145(6):2613-20.
15. Zhou Y, Jiang L, Rui L. Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(17):11152-9.
16. Wittrisch S, Klötting N, Mörl K, Chakaroun R, Blüher M, Beck-Sickinger AG. NPY1R-targeted peptide-mediated delivery of a dual PPAR α/γ agonist to adipocytes enhances adipogenesis and prevents diabetes progression. *Molecular Metabolism*. 2020;31:163-80.
17. Gray JM, Nunez AA, Siegel LI, Wade GN. Effects of testosterone on body weight and adipose tissue: Role of aromatization. *Physiology & Behavior*. 1979;23(3):465-9.