ارتباط تاثیر سولپرید، SCH23390 و الدوپا بر بیان نسبی ژن‌های *نوروپپتید Y* و Kisspeptin در موش‌های صحرایی مدل سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)

لیلا نژاددادگر، فریبا محمودی *، صابر زهری، علیرضا پناهی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

*مسئول مکاتبات: f.mahmoudi@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱٤

چکیده

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) با کاهش آزادسازی دوپامین و افزایش ترشح GnRH، کیس‌پپتین (Kisspeptin) و نوروپپتید Y همراه است. در تحقیق حاضر، اثرات الدوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین بر بیان ژن‌های *KiSS1* و *NPY* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS بررسی شد. بعد از ایجاد PCOS با تزریق استرادیول والرات، ۲۵ موش صحرایی PCOS در پنج گروه سالین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الدوپا، تزریق هم‌زمان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولپرید و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الدوپا، تزریق هم‌زمان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم SCH23390 و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الدوپا یا و تزریق هم‌زمان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولپرید، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم SCH23390 و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم الدوپا را دریافت کردند. پنج موش صحرایی سالم سالین را دریافت کردند. نمونه‌های هیپوتالاموسی جداسازی و فریز شدند. بیان نسبی ژن‌های کیس‌پپتین و *NPY* با روش ریل تایم PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنوای یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی آنالیز شدند. میانگین بیان نسبی ژن‌های *KiSS1* و *NPY* در گروه PCOS در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم افزایش معنی‌دار پیدا کرد (به ترتیب $p = ۰/۰۰۹$ و $p = ۰/۰۰۱$). تزریق ال دوپا سبب کاهش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن‌های *KiSS1* و *NPY* در مقایسه با گروه PCOS شد ($p = ۰/۰۰۱$). تزریق همزمان SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید با اعمال اثرات هم-افزایی سبب مهار اثرات مهاری الدوپا بر میانگین بیان نسبی *KiSS1* در مقایسه با گروه الدوپا شد ($p = ۰/۰٤٥$). مسیر پیام-رسانی دوپامینرژیکی ممکن است از طریق مهار فعالیت نورون‌های کیس‌پپتین و NPY در کاهش ترشح GnRH/LH در موش-های صحرایی PCOS نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: الدوپا، Kisspeptin، NPY، SCH23390، تخمدان پلی‌کیستیک، سولپرید، موش صحرایی.

مقدمه

هیپوتالاموس جایگاه اصلی برای تنظیم متابولیسم و فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز-گنادها (HPG) است و مطالعه بر روی سطوح بیان نوروپپتیدهای هیپوتالاموسی یک هدف بالقوه برای درک مکانیسم-های داخل مغزی دخیل در اختلالات متابولیکی و تولیدمثل محسوب می‌شود. می‌شود (۹، ۱۰). سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یکی از اختلالات نوروآندوکرینی در فرایند تولیدمثل است که با علایم متعددی نظیر سیکل‌های قاعدگی نامنظم (الیگوآمنوره) یا عدم تخمک‌گذاری (آمنوره)، افزایش سطوح سرمی

آندروژن‌ها، افزایش نسبت هورمون لوتئینه‌کننده(LH) به هورمون محرک فولیکولی (FSH) همراه است. اختلال PCOS با بیماری‌های متابولیکی از جمله چاقی مرکزی، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲، اختلالات متابولیسم لیپیدها و بیماری‌های قلبی-عروقی رابطه مستقیم دارد (۲۲، ۲٦).

نوروپپتید Y(NPY) پپتید ۳٦ اسیدآمینه‌ای است که علاوه بر دخالت در تنظیم تعادل انرژی بدن، یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی در کنترل فرآیند تولیدمثل است. آن در سطح هیپوتالاموس از طریق کنترل ترشح GnRH در تنظیم ترشح هورمون‌های جنسی دخالت می‌کند (۵، ۱۲). نوروپپتید Y اثرات تحریکی بر ترشح سرژ GnRH از طریق تاثیر بر نورون‌های GnRH هسته پری‌اپتیک میانی (mPOA) و اثرات مهاری بر ترشح تونیک آنها از طریق تاثیر بر نورون‌های GnRH هسته قوسی (ARC) هیپوتالاموس اعمال می‌کند (۱٦). در حالی که تزریق آنتاگونیست‌های گیرنده NPY سبب مهار آزادسازی GnRH/LH می‌گردد (۱٤). تحقیقات پیشین نشان داده است که در افراد PCOS سطوح سرمی NPY افزایش یافته است (۳، ۷).

کیس‌پپتین (Kisspeptin) نوروپپتید ٥٤ اسیدآمینه‌ای است که طی پردازش پروتئولیتیکی به انواع ۱٤، ۱۳ و ۱۰ اسیدآمینه‌ای با فعالیت فیزیولوژیکی یکسان شکسته می‌شود. نورون‌های کیس‌پپتین به میزان زیادی در هسته قوسی (ARC) و به میزان کمی در هسته پری‌ونتریکولار شکمی قدامی (AVPV) هیپوتالاموس متمرکز شده‌اند (۱۳). گیرنده‌های کیس‌پپتین بر روی نورون‌های GnRH بیان شده است و کیس‌پپتین به‌طور مستقیم بر روی نورون‌های GnRH اثر کرده و آزادسازی گنادوتروپین‌ها را تحریک می‌کند (۱۹). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌های کیس-پپتین در رله کردن اطلاعات متابولیکی به محور تولیدمثلی نقش دارند (۲۵) و در افراد PCOS سطوح سرمی کیس پپتین افزایش یافته است که به نوبه خود افزایش سطوح کیس‌پپتین ممکن است در افزایش سطوح سرمی LH در افراد PCOS دخیل باشد (۲۳).

ال‌دوپا پیش‌ساز نوروترانسمیتر دوپامین است که از نظر کلینیکی در درمان بیماری‌های مرتبط با کاهش آزادسازی دوپامین به وفور استفاده می‌شود. دوپامین و آگونیست‌های گیرنده‌های آن از طریق هر دو گروه گیرنده دوپامینی D_1 و D_2 سبب مهار فعالیت هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادها (HPG) و کاهش آزادسازی GnRH/LH می‌شوند (۲۰، ۲٤).

در افراد PCOS سطوح آزادسازی دوپامین کاهش یافته است که محققان معتقدند این کاهش آزادسازی دوپامین ممکن است با افزایش ترشح GnRH/LH و هیپرپرولاکتینمی در بیماران PCOS مرتبط باشد (۱، ۹).

در هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثرات ال‌دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامین شامل SCH23390 هیدروکلراید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D_1 و سولپرید به عنوان آنتاگونیست گیرنده D_2 بر میانگین بیان نسبی ژن‌های *کیس‌پپتین* و *NPY* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی PCOS می‌باشد.

مواد و روش‌ها

واحدهای آزمایشی: برای انجام این تحقیق، ۳۰ موش صحرایی ماده نژاد ویستار به وزن ۲۲۰-۱۸۰ گرم خریداری شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی استفاده شد. در تمامی مدت آزمایش، آب و غذای مخصوص موش صحرایی آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. مراحل آزمایش با توجه به اصول اخلاقی راهنمای نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی (National Institute of Health Publication No. 80-23, revised 1996) و ملاحظات

اخلاقی مورد تایید کمیته پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی با کد مصوب ۱۳۹٦.۱۵۳ انجام شد.

بررسی واژیناسیون و القای سندروم تخمدان پلی-کیستیک: سیکل استروس منظم موش‌های صحرایی از طریق تهیه اسمیر واژنی به مدت دو هفته تایید شد. پس از مشاهده دو دور سیکل استروس مرتب (به ترتیب پرو استروس، استروس، مت استروس و دی استروس) موش‌های صحرایی جهت شروع آزمایش انتخاب شدند. جهت القای PCOS، استرادیول والرات (پودر تهیه شده از شرکت ابوریحان، ایران) با دوز ۲ میلی‌گرم در ۰/۲ میلی‌لیتر روغن کنجد (شرکت باریج اسانس، ایران) در مرحله استروس از طریق داخل عضلانی تزریق شد.

در ٦۰ روز بعد از تزریق استرادیول والرات بر اساس بررسی‌های واژیناسیون و مشاهده مرحله استروس پایدار و سلول‌های شاخی در اسمیر واژنی القای PCOS مورد تایید قرار گرفت. گرفت (۱۸).

تزریق داروها: برای انجام این آزمایش ۲۵ موش صحرایی PCOS در ۵ گروه (۵ موش صحرایی در هر گروه) به ترتیب تزریق داخل صفاقی سالین، الدوپا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سولپرید (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و الدوپا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق SCH23390 هیدروکلراید (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سولپرید (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۱۰) و الدوپا (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر در ساعت ۹/۳۰-۹ صبح به مدت دو هفته دریافت کردند.

پنج موش صحرایی سالم در مرحله استروس نیز به عنوان گروه کنترل سالم تزریق داخل صفاقی سالین را دریافت کردند. قابل ذکر است که در گروه‌های دریافت‌کننده تزریق آنتاگونیست و الدوپا، آنتاگونیست‌ها ۱۰ دقیقه قبل از الدوپا تزریق گردید. ال- دوپا، SCH23390 هیدروکلراید و سولپرید از شرکت سیگما (Sigma Co., USA) خریداری شدند (٤، ۱۲).

جداسازی نمونه‌های بافتی: حیوانات با استفاده از کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) زایلزین (۱۰ میلی-گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سر حیوانات جدا شد. جمجمه آن شکافته شد و مغز بالافاصله خارج گردید. سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گرفته و برشی به ضخامت ٤ میلی‌متر حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کیاسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی-تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه گردید. نمونه‌های هیپوتالاموس بالافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و در دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری گردیدند.

بررسی میزان بیان ژنی با استفاده از روش Real Time PCR: ابتدا RNAی مطلق نمونه‌های هیپوتالاموسی با استفاده از (Bio Rad Co, pureZol U.S.A) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Themo Scientific, U.S.A) تعیین شد. cDNA تک رشته‌ای با استفاده یک میکروگرم RNA مطلق، بر طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Vivantis Co., Malaysia) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD, U.S.A) سنتز شد.

پس از سنتز cDNA قطعات مورد نظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت سایبرگرین ریل تایم پی‌سی‌آر شرکت تاکارا (Takara Bio Inc., Japan) و با استفاده از دستگاه Real Time PCR وتر ژن مدل ٦۰۰۰ (Rotor Gene 6000, Corbette, Korea) تکثیر شدند. برنامه زمانی برای واکنش PCR کمی شامل یک چرخه (°C ۹۵ برای ۲ دقیقه) و ٤۰ چرخه (°C ۹۵ برای ۵ ثانیه، ٦۰°C برای هر دو ژن *GAPDH* و *KiSS1* یا ٥٤°C برای *NPY* دمای اتصال پرایمرها)

به مدت ۲۵ ثانیه و ۶۰°C برای ۲۰ ثانیه بود. پرایمرها توسط شرکت ژن فناوران ایران سنتز شدند. توالی‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای پرایمرهای سنس و آنتی-سنس ژن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است (جدول ۱).

محصولات *GAPDH*،*KiSS1* و *NPY* حاصل به ترتیب ۱۲۰، ۹۸ و ۱۶۲جفت باز هستند. داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن *GAPDH* با روش دلتا دلتا سی‌تی طبق فرمول $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ محاسبه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده های حاصل از فرمول $^{-\Delta\Delta Ct}$۲ با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی انجام شد. نتایج حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین (± SEM) ارائه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم گردید. در تمام آنالیزهای آماری نتایج با $p\leq$۰/۰۵ معنی‌دار گزارش شدند.

نتایج

میانگین بیان نسبی ژن *NPY* در هیپوتالاموس در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی-دار پیدا کرد (۰۵ (p=۰/۰۰۹)(شکل ۱).

میانگین بیان نسبی ژن *NPY* با تزریق الدوپا، تزریق همزمان SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا، تزریق همزمان سولپرید و الدوپا یا تزریق همزمان سولپرید، SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا نسبت به گروه PCOS از نظر آماری به طور معنی‌دار کاهش یافت(سطح معنی‌داری این سه گروه به ترتیب برابر با ۰/۰۰۱ = p، ۰/۰۰۱= p و ۰/۰۰۱ = p)(شکل ۱).

میانگین بیان نسبی ژن *NPY* در گروه‌های دریافت-کننده تزریق همزمان SCH23390 هیدروکلراید و ال-دوپا، تزریق همزمان سولپرید و الدوپا یا تزریق همزمان سولپرید، SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا در مقایسه با گروه الدوپا از نظر آماری افزایش معنی-دار پیدا نکرد (سطح معنی‌داری این سه گروه به ترتیب برابر با ۰/۹۹۳ = p، ۰/۹۲٤ = p و ۰/۹٦۰= p (شکل ۱).

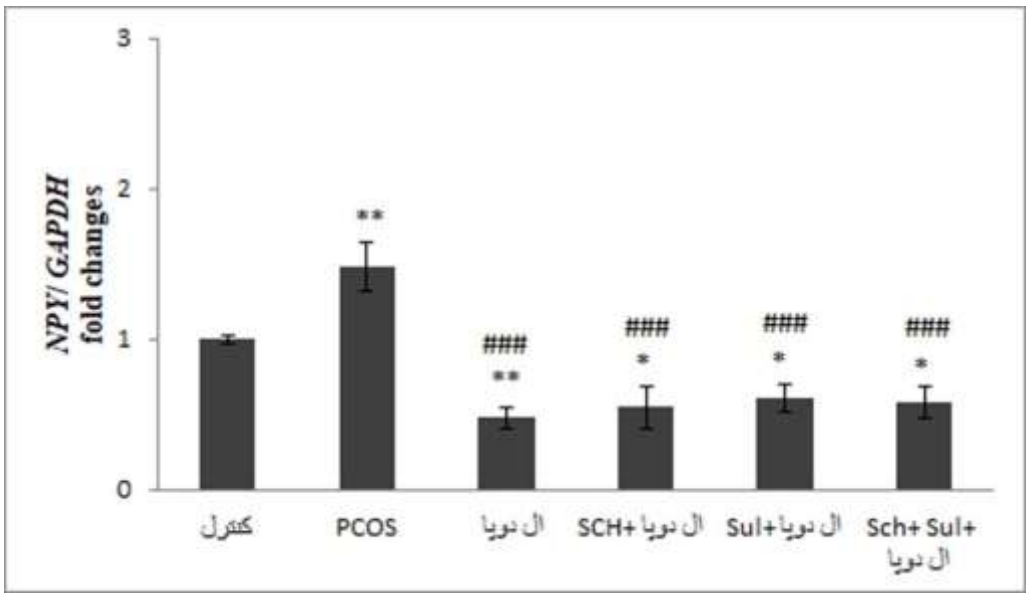
میانگین بیان نسبی ژن *KiSS1* در هیپوتالاموس در گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌دار پیدا کرد (p=۰/۰۰۱)(شکل ۲).

میانگین بیان نسبی ژن *KiSS1* با تزریق الدوپا، تزریق همزمان SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا، تزریق همزمان سولپرید و الدوپا یا تزریق همزمان سولپرید، SCH23390هیدروکلراید و الدوپا نسبت به گروه PCOS از نظر آماری به طور معنی‌دار کاهش یافت (سطح معنی‌داری این سه گروه به ترتیب برابر با ۰/۰۰۱= p، ۰/۰۰۱= p و ۰/۰۰۱= p)(شکل ۲).

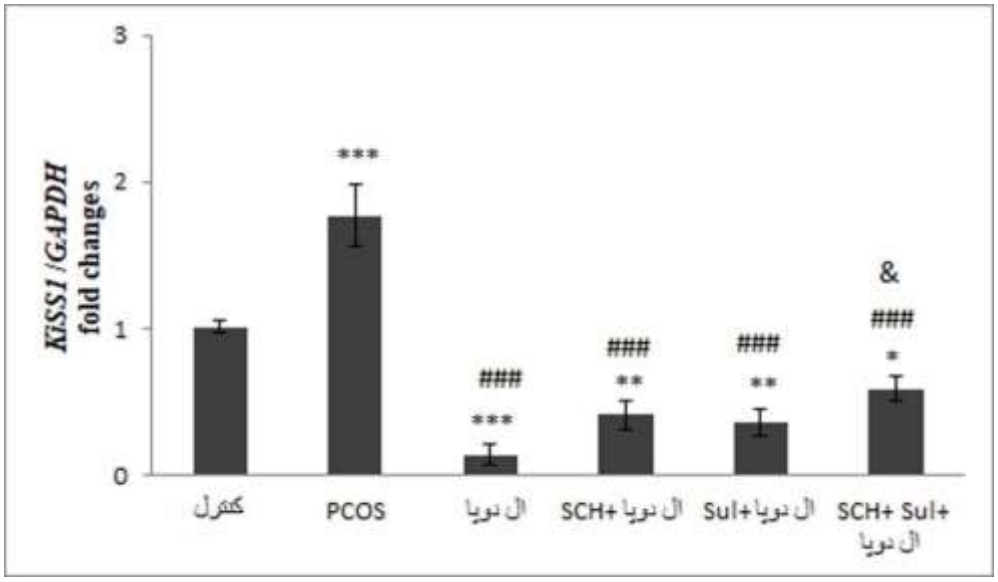
میانگین بیان نسبی ژن *KiSS1* در گروه‌های دریافت-کننده تزریق همزمان SCH23390 هیدروکلراید و ال-دوپا، تزریق همزمان سولپرید و الدوپا یا تزریق همزمان سولپرید، SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا در مقایسه با گروه الدوپا افزایش یافت ولی این میزان افزایش تنها در گروه تزریق همزمان سولپرید، SCH23390 هیدروکلراید و الدوپا در مقایسه با گروه الدوپا از نظر آماری معنی‌دار پیدا بود (سطح معنی-داری این سه گروه به ترتیب برابر با ۰/٥٦٤= p، ۰/۷٤۳= p و ۰/۰٤٥= p)(شکل ۲).

جدول ۱- توالی پرایمرها

پرایمر	توالی در جهت ' ۵ به' ۳(از چپ به راست)
سنس *NPY*	TGGACTGACCCTCGCTCTAT
آنتی‌سنس *NPY*	GTGTCTCAGGGCTGGATCTC
سنس *KiSS1*	TGATCTCGCTGGCTTCTTGGC
آنتی‌سنس *KiSS1*	GGGTTCAGGGTTCACCACAGG
سنس *GAPDH*	AAGTTCAACGGCACAGTCAAG
آنتی‌سنس *GAPDH*	CATACTCAGCACCAGCATCAC



شکل ۱ میانگین بیان نسبی ژن *NPY* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی دریافت کننده الدوپا، تزریق همزمان سولپرید (Sul)، SCH23390هیدروکلراید (SCH) و الدوپا در مقایسه با گروه‌های کنترل یا PCOS. نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است. ❋: در مقایسه با گروه کنترل، #: در مقایسه با گروه PCOS.



شکل ۲ میانگین بیان نسبی ژن *KiSS1* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی دریافت کننده الدوپا، تزریق همزمان سولپرید (Sul)، SCH23390 هیدروکلراید (SCH) و الدوپا در مقایسه با گروه‌های کنترل یا PCOS . نتایج به صورت میانگین ±SEM ارائه شده است. *: در مقایسه با گروه کنترل، #: در مقایسه با گروه PCOS، &: در مقایسه با گروه الدوپا

بحث

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که در موش‌های صحرایی PCOS میانگین بیان نسبی ژن *نوروپپتید Y (NPY)* در هیپوتالاموس نسبت به موش‌های صحرایی سالم افزایش معنی‌دار پیدا کرد نتایج حاضر منطبق بر تحقیقات پیشین است که نشان دادند NPY دارای نقش احتمالی در پاتوژنز سندروم تخمدان پلی‌کیستیک است و در زنان PCOS، *NPY* دارای سطح بالاتری نسبت به زنان سالم است (۳، ۷).

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با تزریق الدوپا میانگین بیان نسبی ژن *NPY* در هیپوتالاموس نسبت به گروه PCOS کاهش یافت. این نتایج منطبق و در راستای تحقیقات پیشین است که نشان دادند که سنتز، آزادسازی و سطوح NPY توسط دوپامین تنظیم می‌شود (۸).

به طوری که تحقیقات پیشین نشان دادند که با بلوکه کردن گیرنده‌های دوپامینرژیکی سطوح NPY در مناطق مختلف مغز افزایش یافت. در حالی که افزایش سطوح دوپامین و تزریق آگونیست‌های گیرنده آن باعث کاهش بیان ژن *NPY* می‌شود (٦، ١٧).

مسیرهای واسطه‌ای دخیل در اعمال اثرات دوپامین بر بیان ژن *NPY* اطلاعاتی در دسترس نیست و یافتن این مسیرها نیاز به تحقیقات آتی دارد ولی می‌توان بر اساس یافته‌های پیشین نقش عملکرد کیس‌پپتین را پیشنهاد داد.

طبق مطالعاتی که تاکنون انجام‌شده کیس‌پپتین باعث تحریک نورون‌های GnRH از طریق تنظیم مستقیم نورون NPY می‌شود. تحقیقات پیشین نشان دادند که کیس‌پپتین بیان ژن و آزادسازی NPY را در سلول‌های mHypoE –38 تحریک می‌کند، ولی در سلول‌های mHypoE- 42 چنین اتفاقی رخ نداد.

آنها نتیجه‌گیری کردند که سلول‌های mHypoE-38 مرتبط با نورون‌های NPY دخیل در مسیر تولیدمثلی است و سلول‌های mHypoE-42 مرتبط با نورون‌های NPY دخیل در مسیر تغذیه است (١٤).

همچنین در مطالعه دیگر که با مطالعه بر روی گوسفندان ماده نشان داده است که ارتباطات متقابل میان سلول‌های کیس‌پپتین و سلول‌های NPY وجود دارد (۱۶).

از آنجایی‌که دوپامین باعث مهار کیس‌پپتین می‌شود (۱۳) بنابراین با تزریق دوپامین، کیس‌پپتین مهارشده که این امر به‌نوبه خود باعث مهار بیان ژن *NPY* می‌شود.

نتایج حاضر نشان داد که تزریق همزمان هر دو نوع آنتاگونیست سولپرید و SCH23390 هیدروکلراید به صورت سینرژیستی عمل کرده و منجر به بلوکه کردن اثرات تحریکی الدوپا بر بیان کیس‌پپتین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مبتلا به PCOS می‌گردد افزایش فعالیت نورون‌های دوپامینرژیکی ممکن است در درمان و درک مکانیسم ناباروری ناشی از PCOS با دخالت در تنظیم سنتز هورمون‌ها و نوروپپتیدهای مختلف دخیل در محور نورواندوکرینی آن از نظر کلینیکی مفید باشد.

در این تحقیق اثرات تزریق داخل صفاقی ال دوپا و آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی بر بیان ژن‌های *کیس‌پپتین* و *NPY* بررسی شد. برای درک بهتر نقش نورون‌های دوپامینرژیکی داخل هیپوتالاموسی در پاتوژنز PCOS، در تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود که اثرات تزریق داخل بطنی-مغزی دوپامین و آنتاگونیست‌های مختلف گیرنده‌های دوپامینی بر غلظت سرمی یا بیان نسبی ژن‌های *کیس‌پپتین*، *NPY* و سایر پپتیدهای دخیل در پاتوژنز PCOS از جمله *گزلین*، *آدیپونکتین*، *لپتین*، آروماتاز و غیره در هیپوتالاموس، بافت چربی و تخمدان بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین بیان نسبی ژن‌های *کیس‌پپتین* و *NPY* در هیپوتالاموس گروه PCOS در مقایسه با گروه سالم از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش یافت. تزریق ال دوپا سبب کاهش معنی‌دار میانگین بیان نسبی ژن‌های *کیس‌پپتین* و *NPY* در مقایسه با گروه PCOS گردید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه محقق اردبیلی و از دانشگاه شهید بهشتی برای تهیه دستگاه‌های مورد نیاز در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Ayano G. 2016. Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: Review of literatures. *J Ment Disord Treat*, 2(2): 1-4.

2. Backholer K., Smith J., Rao A., Pereira A., Iqbal J., Ogawa S., Clarke L. 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 151(5): 2233–2243.

3. Baranowska B., Radzikowska M., Wasilewska-Dziubihska E., Kaplihski A., Plonowski A. 1999. Neuropeptide Y, leptin, galanin in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 13: 344-351.

4. Bekhtereva E.P. 1976. Effect of L-dopa on the gonadotropic function of the pituitary gland. *Prob Endokrinol (Mosk)*, 22(4): 50-54.

5. Besecke L.M., Wolfe A.M., Pierce M.E., Takahashi J.S., Levine J.E. 1994. Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells. *Endocrinology*, 135(4): 1621-1627.

6. Bina K.G., Cincotta A.H. 2000. Dopaminergic agonists normalize elevated hypothalamic neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone, body

weight gain, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Neuroendocrinology*, 71(1): 68-78.

7.Bukan N., Güneş M. 2015. Examination of angiopoietin-like protein 4, neuropeptide y, omentin-1 levels of obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 31(11): 903-906.

8. Cao G., Gardner A., Westfall T.C., 2007. Mechanism of dopamine mediated inhibition of neuropeptide Y release from pheochromocytoma cells (PC12 cells). *Biochem Pharmacol*, 73(9):1446-1454.

9. Chaudhari N., Dawalbhakta M., Nampoothiri L. 2018. GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reprod Biol Endocrinol*, 16(1): 37.

10. Chittawar P.B., 2012. Kisspeptin: Role in reproduction and implications for infertility management. *J Hum Reprod Sci*, 5(2): 226.

11. Dhillon S.S., Gingerich S., Belsham D.D., 2009. Neuropeptide Y induces gonadotropin-releasing hormone gene expression directly and through conditioned medium from mHypoE-38 NPY neurons. *Regul Pept*, 156: 96-103.

12. Goodman R.L., Maltby M.J., Millar R.P., Hileman S.M., Nestor C.C., Whited B., Tseng A.S., Coolen L.M., Lehman M.N. 2012. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrous ewes. *Endocrinology*, 153: 5918-5927.

13. Harter C.J.L., Kavanagh G.S., Smith. J.T., 2018. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *Journal of Endocrinology*, 238(3): 173-183.

14. Karla P.S., Bonavera J.J., Karla S.P. 1995. Central administration of antisense oligodeoxynucleotid of neuropeptide Y(NPY) mRNA levels the critical role of newly synthesized in regulation of LHRH release. *Regul Pept*, 59: 215-220.

15. Kim G.L., Dhillon S.S., Belsham DD., 2010. Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 151(10): 5038 –5047

16. Kiyokawa M., Matsuzaki T., Iwasa T., Ogata R., 2011. Neuropeptide Y mediates orexin A-mediated suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in ovariectomized rats. Medical Investigation, 58: 11-18.

17. Kuo D.Y., 2002. Co-administration of dopamine D1 and D2 agonists additively decreases daily food intake, body weight and hypothalamic neuropeptide Y level in rats. *J Biomed Sci*, 9(2): 126-132.

18. Lara H.E., Dissen G.A., Leyton V., Paredes A., Fuenzalida H., Fiedler J.L., Ojeda S.R., 2000. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*, 141(3):1059-1072.

19. Lehman M.N., Hileman S.M., Goodman R.L. 2013. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol*, 784: 27-62

20. Liu X., Herbison A.E., 2013. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology*, 154(1): 340-350.

21. Pfaus J.G., Phillips A.G., 1991. Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behav Neurosci*, 105(5): 727-743.

22. Polak K., Czyzyk A., Simoncini T., 2017. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*, 40(1): 1-8.

23. Tang R., Ding X., Zhu J., 2019. Kisspeptin and Polycystic Ovary Syndrome. *Front of Endocrinology (Lausanne)*, 10: 298.

24. Venegas-Meneses B., Padilla J.F., Juárez C.E., Morán J.L., Morán C., Rosas N, Silva A.H., Dominguez R., 2015. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50(3): 783-796.

25.Wahab F., Atika B., Shahab M., 2013. Kisspeptin as a link between metabolism and reproduction: evidences from rodent and primate studies. *Metabolism*, 62(7): 898-910.

26. Wang J., Wu D., Guo H., Li M., 2019. Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome. *Life Science*, 236: 116940.